

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

CAROLINA MARIA MEDEIROS DO AMARAL

**POLIMORFISMOS T309G *MDM2* E C590T *WAF1* E A
SUSCEPTIBILIDADE ÀS LESÕES E CÂNCER CERVICAIS**

RECIFE - PE

2012

CAROLINA MARIA MEDEIROS DO AMARAL

**POLIMORFISMOS T309G *MDM2* E C590T *WAF1* E A
SUSCEPTIBILIDADE ÀS LESÕES E CÂNCER CERVICAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Dr. Antonio Carlos de Freitas

Recife, PE

2012

Catálogo na fonte
Elaine Cristina
CRB 1728

Amaral, Carolina Maria Medeiros do
Polimorfismos T309G MDM2 e C590T WAF1e a susceptibilidade às
lesões e câncer cervicais/ Carolina Maria Medeiros do Amaral. – Recife: O
Autor, 2012.

84 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Genética, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Polimorfismos (genética) 2. Papilomavírus 3. Câncer de**
útero I. Freitas, Antonio Carlos (orientador) II. Título

579.135

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-219

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Parecer da comissão examinadora da dissertação de:
Carolina Maria Medeiros do Amaral

Intitulada:

**Polimorfismos T309G *MDM2* E C590T *WAF1* e a Susceptibilidade às lesões e
câncer cervicais**

A comissão examinadora considera o presente trabalho
APROVADO

Portanto, cumprida todas as exigências regimentais, Carolina Maria Medeiros do
Amaral faz juz ao grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular pela UFPE.
Recife, 02/03/2012.

Banca Examinadora:


Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz


Dra. Neide Santos


Dra. Ivone Antonia de Souza

Orientador:


Dr. Antonio Carlos de Freitas

Coordenador do Programa:


Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Aos meus pais dedico, com todo amor

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, autor da vida, que com seu eterno e sublime amor, tem cuidado de mim e me guiado em todos os passos.

Aos meus pais, Ronaldo e Eliane, por todo o amor, compreensão, apoio e incentivo que nunca me deixaram faltar.

Às minhas irmãs, Rafaela, Juliana e Ana Beatriz pelo companheirismo, cumplicidade, apoio e principalmente paciência nas minhas horas difíceis.

Ao meu amor Edu (sobrinho), que embora tão pequenino já nos trouxe tantas alegrias.

Aos meus avós, Eliel e Maria por estarem sempre em oração e à minha inteira disposição em todos os momentos.

Ao professor Antonio Carlos por me dar a oportunidade de fazer parte do LEMTE e pela confiança depositada em mim.

À professora Tereza Cartaxo por sempre estar disposta a ajudar, a ensinar. Obrigada pelas inúmeras dúvidas tiradas.

Às amigas de apartamento, Angélica, que me apresentou ao professor Antonio Carlos e foi a grande incentivadora de tudo; à Jack pelas conversas, conselhos e apoio em todos os momentos e à Pavla pelas sugestões, pela ajuda incansável e fundamental nesse trabalho.

Às minhas amigas Isadora e Rafaelle, que embora longe, sempre me incentivaram e me deram apoio.

Aos meus queridos amigos do LEMTE, André, Eliane, Filipe, Tchetcha (Marcelo), Bárbara, Luciana, Karin, Karen, Breno, Elyda, Barbosinha, Janaíne, Nayara, Erinaldo, Ceíça e ao amigo de curso, Billy. Obrigada pelas sugestões, discussões, conversas, piadas, gargalhadas, almoços, pizzas, em fim, por tornar o LEMTE um lugar tão agradável e prazeroso de trabalhar.

À André, por todas as dúvidas, placas, digestões e PCR tiradas, pelas conversas, pelos inúmeros questionamentos que fizeram refletir e pelas muitas dúvidas que ficaram sem respostas.

À Bárbara, sempre disposta ajudar em todos os momentos.

Ao pessoal do laboratório central, Heidi, Tereza, José Roberto, sempre prontos a me ajudar quando precisei.

À Dr. Eugênia e à técnica Marilene do departamento de oncologia do Hospital Oswaldo Cruz-UPE, pessoas fundamentais para a realização desse trabalho.

Ào amigo Zaqueu, pela colaboração na parte técnica.

Aos funcionários do departamento de genética, D. Zizi e Sr. Romildo.

E a todos que de uma maneira direta e indireta estiveram comigo me apoiando e incentivando nessa caminhada.

“Quanto melhor é adquirir a sabedoria do que o ouro! E quanto mais excelente é
escolher o entendimento do que a prata!”

Rei Salomão

RESUMO

Pequenos vírus de DNA, os Papilomavírus humano (HPV), são transmitidos por via sexual e infectam mucosas e epitélios levando ao desenvolvimento de tumores benignos, os quais podem evoluir para um processo carcinogênico. Este vírus apresenta seu genoma dividido em regiões de expressão precoce e tardia. Dentre as de expressão precoce, estão as regiões E6 e E7 as quais codificam para proteínas que interferem no ciclo celular do hospedeiro. A proteína viral E6 interage com a proteína celular p53 inibindo sua função supressora de tumor. Enquanto isso, a proteína E7 interage com a proteína pRb, também supressora de tumor, possibilitando a passagem do ciclo celular da fase G1 para a fase S. Dessa forma, o HPV é responsável pela transformação celular. Considerada o principal agente etiológico do câncer cervical, a infecção por HPV é necessária, porém não suficiente nesse processo. Fatores ambientais e genéticos têm sido apontados como cofatores, sendo esse último responsável por 37% do risco total. Polimorfismos no gene TP53 bem como naqueles envolvidos na via da p53 têm sido relacionados com a susceptibilidade a lesões e câncer cervicais. Este trabalho teve como objetivo avaliar, em mulheres infectadas com HPV, a possível associação de polimorfismos em dois genes envolvidos na via da p53, *MDM2* (SNPT309G) e *WAF-1* (SNPC590T) com o aumento da susceptibilidade a lesões e câncer cervicais. Para tanto, foi utilizada a técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Os dados foram analisados através de testes estatísticos qui-quadrado de Pearson, teste G de aderência, equilíbrio de Hardy-Weinberg e teste exato de Fisher. Não se observou diferenças significativas entre as frequências alélicas e genotípicas entre grupos de casos e de controles nos dois genes analisados. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que os polimorfismos *MDM2* (SNPT309G) e *WAF-1* (SNPC590T) não estão associados com lesões e câncer cervicais em pacientes da região nordeste do Brasil.

Palavras-chave: Papilomavírus humano (HPV), câncer cervical, polimorfismos, *MDM2*, *WAF1*.

ABSTRACT

Small DNA viruses, the human papillomavirus (HPV) are sexually transmitted and infect mucosal and epithelia tissue leading to the development of benign tumors, which can progress to a carcinogenic process. Its genome is divided into regions with early and late expression. Among the early expression, E6 and E7 encoded proteins that interfere in host cellular cycle. The viral E6 protein interacts with the cellular protein p53 and inhibits its tumor suppressor function. The E7 protein interacts with the pRb protein, also tumor suppressor, allowing the passage of the cell cycle from G1 phase to S phase. Thus, HPV is responsible for cell transformation. Considered the main etiological agent of cervical cancer, HPV infection is necessary but not sufficient in this process. Environmental and genetic factors have been implicated as cofactors, the latter being responsible for 37% of total risk. Polymorphisms in TP53 gene as well as those involved in the p53 pathway have been linked with susceptibility to cervical lesions and cancer. The aim of this work was to analyze women infected with HPV to evaluate the possible association of polymorphisms in two genes involved in the p53 pathway, *MDM2* (SNPT309G) and *WAF1* (SNPC590T) with increasing susceptibility to cervical lesions and cancer. To this, the technique Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) was used. The data was analyzed by Pearson chi-square test, G adhesion test, Hardy-Weinberg equilibrium and Fisher's exact test. No significant differences were observed between the allelic and genotypic frequencies between groups of cases and controls in the two genes analyzed. The results of this study suggest that the *MDM2* polymorphism (SNPT309G) and *WAF1* (SNPC590T) are not associated with cervical lesions and cancer in patients from the Northeastern of Brazil.

Key-Words: Human papillomavirus (HPV), cervical cancer, polymorphisms, *MDM2*, *WAF1*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, para o ano de 2012 de câncer cervical no Brasil.	18
Figura 2: Taxa da idade padrão de incidência e mortalidade para o câncer cervical.	18
Figura 3: Modificações histológicas no desenvolvimento do NIC e do câncer cervical.	20
Figura 4: Representação linear do genoma do Papilomavírus Humano.	23
Figura 5: Ciclo de infecção do HPV.....	26
Figura 6: Ativação e função da p53.	31
Figura 7: Regulação positiva e negativa da p53.	33
Figura 8: Mecanismo de ação da via p53.....	33
Figura 9: Cromossomo 12..	34
Figura 10: Esquema da região intrônica do gene MDM2.....	35
Figura 11: Modelo proposto para interação do SNP309 de MDM2 com hormônios e estresse ambiental.	36
Figura 12: Cromossomo 6..	37
Figura 13: Mecanismos de ação de p21.....	38
Figura 14: Representação esquemática do polimorfismo T309G do gene MDM2 após amplificação e digestão com enzima PstI.	44
Figura 15: Representação esquemática do polimorfismo C590T do gene WAF1 após amplificação e digestão com enzima PstI.....	45
Figura 16: Frequência das pacientes nos diferentes grupos etários.....	47
Figura 17: Grupo de pacientes dividido em não relação ao uso de cigarro.....	458
Figura 18: Percentagem das pacientes em relação à idade da 1ª relação sexual.	458
Figura 19: Percentagem das pacientes em relação ao número de parceiros sexuais	459
Figura 20: Percentagem das pacientes em relação ao uso de preservativos.....	459
Figura 21: Percentagem das pacientes em relação ao uso de anticoncepcionais.	450

Figura 22: Percentagem das pacientes em relação ao número de partos.	50
Figura 23: Percentagem das pacientes em relação ao estado civil.....	51
Figura 24: Percentagem das pacientes infectadas com HPV.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de HPV e suas respectivas doenças associadas.	22
Tabela 2 - Primers utilizados para detecção e tipificação do Papilomavirus.....	43
Tabela 3: Relação dos oligonucleotídeos (primers) utilizados para análise dos polimorfismos.....	45
Tabela 4: Características clínicas-biológicas e sócio-demográficas das pacientes de acordo com a presença ou ausência de lesão.....	544
Tabela 5: Valores de p e χ^2 para as análises do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos controles, casos, lesões de baixo e alto grau.....	555
Tabela 6: Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo T309G do gene MDM2 e C590T do gene WAF1 entre os grupos casos, LSIL, HSIL comparados aos controles.....	577

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ASC-H	Celulas escamosas atipicas de alto grau
CDK	Quinase dependente de ciclina
DNA	Acido desoxinucleotideo
dNTP	Desoxirribonucleotideos Fosfatados
E	Gene que codifica a proteína <i>Early</i>
E2F	Fator de transcrição
E6AP	Complexo E6 ligase ubiquitina celular
HIV	Virus da imunodeficiência adquirida
HPV	Papilomavirus Humano
HSIL	Lesao intra-epitelial de alto grau
kDa	Quilodaltons
L	Gene que codifica a proteína <i>Late</i>
LCR	Longa Regiao de Controle
LSIL	Lesao intra-epitelial de baixo grau
LSIL-H	Lesoes Intra-epitelias de baixo e alto grau
MDM2	Gene Murine Double Minute-2
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
mM	Milimolar
NIC	Neoplasia Cervical Intraepitelial
ORF	Quadro aberto de leitura (<i>Open Reading Frame</i>)
p53	Proteina p53
Pb	Pares de bases
PBS	Solução tampão fosfato-salino
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	Reacao em cadeia da polimerase
pRb	Proteina do retinoblastoma
PV	Papilomavirus
RE	Response Elements
RNA _m	Acido ribonucleotideo mensageiro

SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>)
Sp1	Proteína de especificidade 1 (specificity protein 1)
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>).
TBS	Sistema de Bethesda
URT	Região não traduzida
WAF1	Gene Wildtype p53-Activated Fragment 1
χ^2	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1- Câncer cervical.....	17
2.2 - Papilomavírus.....	20
2.2.1 – Papilomavírus Humano.....	21
2.2.1.1 – Genoma Viral.....	23
2.2.1.2 – Ciclo Viral.....	25
2.2.1.3 – Integração do HPV e a Carcinogênese.....	27
2.3 – Fatores que atuam juntamente com HPV no desenvolvimento do câncer cervical.....	27
2.4 – Via p53.....	30
2.4.1 – Gene <i>MDM2</i>	34
2.4.1.1 – Polimorfismo T309G no gene <i>MDM2</i>	35
2.4.2 – Gene <i>WAF1</i>	37
2.4.2.1 – Polimorfismo C590T no gene <i>WAF1</i>	39
3. OBJETIVOS.....	40
4. MATERIAS E MÉTODOS.....	41
5. RESULTADOS.....	47
6. DISCUSSÃO.....	58
7. CONCLUSÕES	65
8. REFERÊNCIAS.....	66
9. ANEXOS.....	83
10. MEMORIAL DO ALUNO.....	84

1. INTRODUÇÃO

Câncer cervical é o terceiro tipo de câncer feminino mais frequente ocupando o quarto lugar no índice de mortalidade. A expectativa mundial para 2012 é de mais de 570 mil novos diagnósticos com cerca de 290 mil óbitos. Para o Brasil os valores são de mais de 17 mil novos casos com aproximadamente 4.800 mortes. As estimativas para novos casos no estado de Pernambuco, é de 970 dos 5 mil casos que serão diagnosticados na região Nordeste.

O câncer cervical configura um problema de saúde pública com grandes possibilidades de cura se diagnosticado precocemente. A triagem dessa doença consiste de exame citológico (exame de Papanicolau), no qual se observa a morfologia das células do colo uterino. O câncer cervical passa por diferentes estágios pré-malignos que são chamados de lesões intra-epiteliais escamosas de baixo (LSIL) e alto grau (HSIL).

O principal agente etiológico do câncer cervical é o Papilomavírus humano (HPV), que são pequenos vírus de DNA dupla fita, circular pertencente à família Papillomaviridae. São vírus que induzem o desenvolvimento de verrugas e papilomas tanto no epitélio cutâneo quanto mucoso do hospedeiro. Assim, são classificados em cutaneotrópicos (infectam pele das mãos e dos pés) e musotrópicos (infectam boca, garganta, vias respiratórias e epitélio anogenital), destes trinta infectam a mucosa genital. De acordo com seu poder oncogênico, podem ser considerados de baixo e alto risco.

Contudo, infecção por HPV sozinha não é suficiente para induzir o desenvolvimento de lesões cervicais. Fatores ambientais e genéticos têm grande importância nesse processo, sendo estes últimos responsáveis por 37% do risco total. O gene *MDM2* (Murine Double Minute 2) é o regulador negativo da p53, proteína supressora de tumor responsável pela apoptose e inibição da proliferação celular. A expressão do gene *MDM2* é ativada pela p53. O produto da expressão é a proteína Mdm2, a qual interage com a p53 inibindo sua atividade transcricional bem como de supressora de tumor. Polimorfismos no gene *MDM2* aumentam sua expressão e consequentemente os níveis de sua proteína nas células. Elevados

níveis de Mdm2 diminuem os níveis de p53. Polimorfismos em *MDM2* têm sido associados a diversos tipos de tumores.

Outro gene envolvido é *WAF1* (Wildtype p53-Activated Fragment 1), cujo produto, proteína p21, atua como supressor de tumor. Este gene também tem sua expressão regulada pela p53 em resposta a um dano no DNA. Uma vez na célula, p21 atua interrompendo o ciclo celular na fase G1. Polimorfismos na região 3'UTR de *WAF1* podem interferir na instabilidade do RNAm e consequentemente na função de sua proteína.

Alguns estudos sugerem que pacientes que apresentam tais polimorfismos teriam um risco maior de desenvolver lesões e câncer cervicais. Assim, este trabalho teve como finalidade avaliar o possível aumento da susceptibilidade a lesões e câncer cervicais induzidos pela presença de polimorfismos nos genes *MDM2* e *WAF1* em pacientes infectadas com HPV.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Câncer Cervical

Terceiro tipo de câncer mais comum, o câncer cervical é a quarta causa de morte por câncer em mulheres no mundo sendo responsável por 9% (529.800 casos) do total de casos de câncer e por 8% (275.100 casos) das mortes por câncer entre mulheres no ano de 2008 (JEMAL *et al.*, 2011).

No mundo aproximadamente 570.000 novos casos de câncer cervical serão diagnosticados com uma estimativa de 288.000 mortes para 2012 (JEMAL *et al.*, 2011). De acordo com a Associação Americana de Câncer (ACS), cerca de 12.710 novos casos serão diagnosticados e 4.290 mulheres morrerão apenas nos Estados Unidos.

No Brasil as estimativas para novos casos são de 17.540 com uma estimativa de risco de 17 casos para 100 mil mulheres. O número de mortes chegará a 4.812, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2011). Com exceção do câncer de pele não melanoma, o câncer cervical lidera a incidência na região Norte, com 24 casos por 100 mil mulheres, seguida da região Nordeste e Centro-oeste com 28 por 100 mil e 18 por 100 mil mulheres, respectivamente, ocupando o segundo lugar, seguida da região Sudeste (15 por 100 mil) ocupando o terceiro lugar e por último, encontra-se a região Sul (14/100 mil) ocupando o quarto lugar (Figura 1). As estimativas para novos casos na região Nordeste é de 5.050. O estado de Pernambuco será responsável por 970 destes (INCA, 2011).

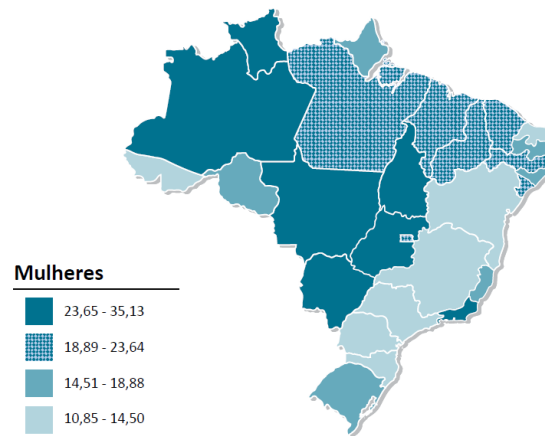


Figura 1: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres para o ano de 2012 de câncer cervical no Brasil. FONTE: INCA (2011).

Considerado um problema de saúde pública, o câncer cervical é mais prevalente em países em desenvolvimento (Figura 2), responsáveis por 85% dos casos (JEMAL *et al.*, 2011). Porém, trata-se de uma doença que pode ser prevenida e, se diagnosticada precocemente, curada.

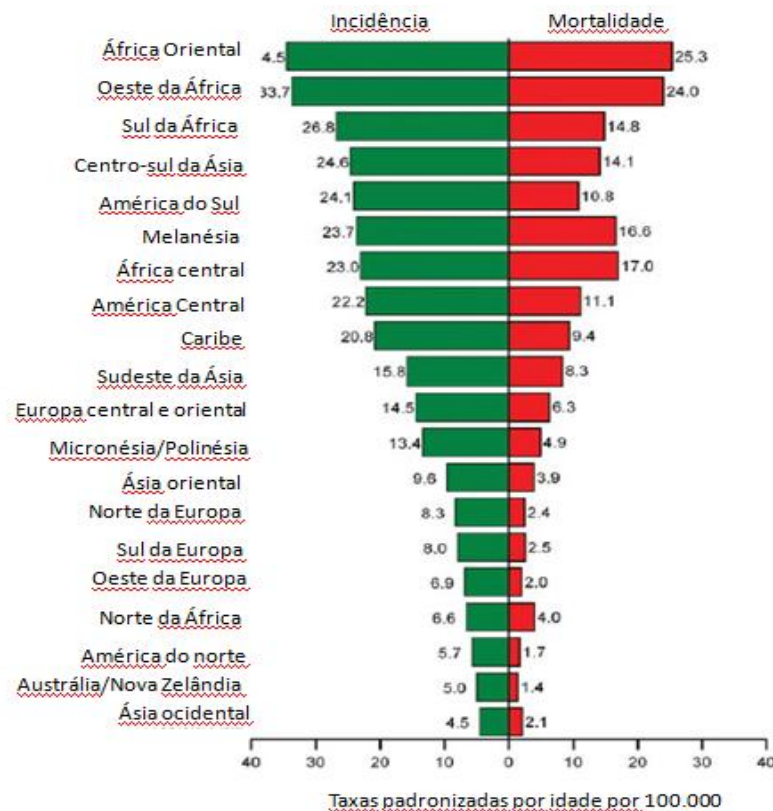


Figura 2: Taxa da Incidência e mortalidade para o câncer cervical em mulheres no mundo. Adaptado de JAMEL *et al.* (2011).

A triagem do câncer cervical é feita através do exame Papanicolau, que consiste de um exame citológico onde se observa a morfologia das células do colo uterino. A redução da incidência e mortalidade nos países desenvolvidos, em particular os Estados Unidos, tem sido graças à disponibilidade e eficiência dos programas de triagem (SIMARD *et al.*, 2012).

Em 1969, Richart e Barron confirmaram que a infecção por papilomavírus humano (HPV) se faz necessária para o desenvolvimento do câncer cervical, onde o seu precursor é a neoplasia cervical intra-epitelial (NIC) (RICHART; BARRON, 1969; WANG *et al.*, 2010), a qual passa por diferentes graus de diferenciação histológica. Essas neoplasias foram primeiramente classificadas em leve (NIC 1), moderada (NIC 2) e neoplasia-carcinoma *in situ* (NIC 3) (RICHART, THOMAS, WRIGHT, 1993).

Diversas nomenclaturas foram criadas, ao longo do tempo, para classificar as anormalidades apresentadas pelas células durante estágios pré-malignos do câncer cervical (BEKKERS *et al.*, 2004). Em 2001, o Sistema de Bethesda (TBS) classificou as lesões intra-epiteliais escamosas em lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) e lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau (HSIL). Em alguns casos o diagnóstico é incerto e o grau da lesão não pode ser determinado. O TBS, então, padronizou a terminologia. Tais lesões foram classificadas como ASC-H, que inclui LSIL com células escamosas atípicas onde não se pode excluir HSIL e também aquelas que não apresentam LSIL; e LSIL-H, onde se encontram LSIL que não podem excluir HSIL e aquelas que raramente são sugestivas de células atípicas, mas não são diagnosticadas como HSIL (INCE; AYDIN; PEKER, 2011). A figura 3 mostra a progressão das neoplasias com suas respectivas diferenciações histológicas de acordo com o grau da lesão.

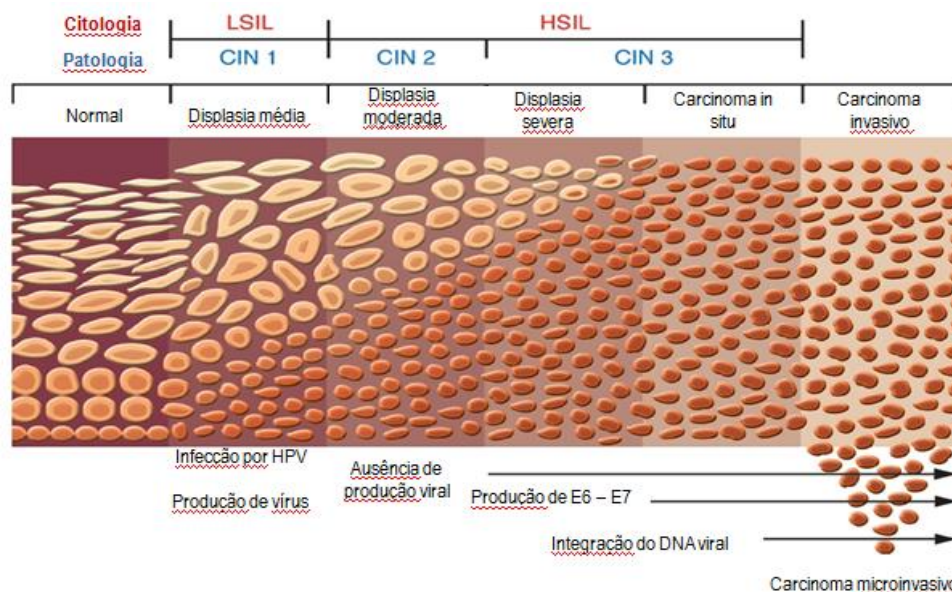


Figura 3: Modificações histológicas no desenvolvimento das lesões e do câncer cervical. Adaptado de Bekkers *et al.* (2004).

2.2. Papilomavírus

Os papilomavírus (PV) são responsáveis por induzirem o desenvolvimento de tumores benignos, conhecidos como verrugas e papilomas, no epitélio cutâneo ou mucoso de seu hospedeiro (DE VILLIERS *et al.*, 2004). São vírus espécie-específico que possuem uma grande diversidade, ocorrendo em mamíferos, aves e répteis (SCHEURER *et al.*, 2005).

Os papilomavírus eram anteriormente agrupados juntos com os Polyomavirus numa mesma família, *Papovaviridae* baseado na similaridade dos capsídeos não-envelopados e no genoma composto de DNA dupla fita circular. Posteriormente foram reconhecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) como dois grupos virais que apresentam genomas de tamanhos e organizações diferentes e sem muita similaridade entre seus aminoácidos e nucleotídeos. Desde então, foram considerados como duas famílias separadas, *Papillomaviridae* e *Polyomaviridae* (DE VILLIERS *et al.*, 2004).

A classificação taxonômica atual se baseia na sequência nucleotídica conservada do gene L1 para identificar tipos, subtipos e variantes de PV. PV que apresentam diferenças maiores que 10% entre as ORF L1 são consideradas novos

tipos. Diferenças entre 2 a 10%, são considerados subtipos e por fim, diferenças menores que 2% são encontradas nas variantes (DE VILLIERS *et al.*, 2004).

Os papilomavírus possuem 29 gêneros designados por letras gregas, que compreendem mais de 189 tipos (BERNARD *et al.*, 2010). Os Papilomavírus humanos são membros de cinco grupos de gêneros (*Alfapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus*). O gênero *Alfapapillomavirus* compreende os tipos que são mais patológicos e estão associados com lesões cutâneas e mucosas, tanto orais quanto genitais. O gênero *Betapapillomavirus* está associado com epidermodisplasia verruciforme maligna e benigna, enquanto o gênero *Gamapapillomavirus* com lesões benignas (SHEN-GUNTHER *et al.*, 2011). Os HPV associados ao gênero *Mupapillomavirus* estão envolvidos com lesões cutâneas e os do gênero Nu, envolvidos tanto em lesões cutâneas benignas quanto malignas (DE VILLERS *et al.*, 2004).

2.2.1 – Papilomavírus Humano

Os papilomavírus humano (HPV) são vírus, relativamente pequenos, medindo 55 nm de diâmetro. Apresenta uma simetria icosaédrica, com capsídeo composto por 72 pentâmeros. Além disso, contém um DNA fita dupla circular com aproximadamente 7.900 pares de bases associados com histonas H2a, H2b, H3 e H4. (FAVRE *et al.*, 1977).

Existem mais de 120 genótipos de HPV conhecidos, reunidos em dois grupos: mucosotrópicos e cutaneotrópicos (BERNARD *et al.*, 2010). Os mucosotrópicos infectam a mucosa da boca, garganta, vias respiratórias e epitélio anogenital (BURD, 2003). Os mucosotrópicos contêm até trinta tipos que infectam a mucosa cervical. Neste grupo estão incluídos os tipos que causam lesões cervicais com alto (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82) e baixo riscos (6, 11, 40, 42, 43, 44, 45, 54, 61, 70, 72, 81) de progressão para o câncer (CORNEANU; STĂNCULESCU; CORNEANU, 2011). Os tipos cutaneotrópicos têm como alvo a pele das mãos e dos pés (BURD, 2003). A tabela 1 mostra os tipos de HPV bem como as doenças a eles associadas.

Condilomas ou verrugas genitais são as características clínicas mais conhecidas da infecção por HPV e 90% dos casos estão associadas à infecção por HPV 6 e 11 (CASTELLSAGUÉ, 2008). Os tipos de alto risco 16, 18, 45 e 31 estão associados às lesões cervicais, infecções da vulva, da vagina, do pênis e anal (CASTELLSAGUÉ, 2008).

Tabela 1: Tipos de HPV e suas respectivas doenças associadas.

Doença	Tipo de HPV
Verrugas plantares	1, 2 , 4, 63
Verrugas comuns	2, 1, 7 , 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65, 77, 1, 3, 4, 10, 28
Verrugas planas	3, 10 , 26, 27, 28, 38, 41, 49, 75, 76
Outras lesões cutâneas (cistos epidermóides, carcinoma de laringe)	6, 11, 16, 30, 33, 36, 37, 38, 41, 48, 60, 72, 73
Epidermodisplasia verruciforme	2, 3, 10, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17 , 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50
Papilomatoses respiratórias recorrentes	6, 11
Hiperplasia epitelial focal de Heck	13, 32
Papilomas/carcinomas conjuntivais	6, 11, 16
Condiloma acuminata (verruga genital)	6, 11 , 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55, 70
Neoplasia Cervical Intraepitelial	30, 34, 39, 40, 53, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69
Inespecífica	
Baixo risco	6, 11 , 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 74
Alto risco	16, 18 , 6, 11, 31, 34, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 66
Carcinoma Cervical	16, 18 , 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66, 68, 70

Adaptado de Burd (2003). Em negrito as associações mais frequentes.

2.2.1.1 - Genoma viral

O genoma do Papilomavírus humano é funcionalmente dividido em três regiões como mostrado na figura 4. Possui uma região não regulatória codificante, LCR (*Long Control Region*), uma região E (*Early*) contendo genes de expressão precoce e uma região L (*Late*) contendo genes de expressão tardia (ZUR HAUSEN, 1996).



Figura 4: Representação linear do genoma do Papilomavírus Humano com aproximadamente 8 kb de tamanho contendo genes não estruturais de expressão precoce (E), genes estruturais de expressão tardia (L) e região regulatória LCR. Adaptado de MUÑOZ *et al* (2006).

A região LCR apresenta aproximadamente 400-1000 pares de bases. Contém uma região promotora p97 além das sequências acentuadoras e silenciadoras que regulam a replicação do DNA controlando a transcrição das ORF (BURD, 2003). A atividade do promotor p97 é regulada por proteínas virais e celulares as quais interagem com sítios específicos na região LCR atuando assim, na regulação transcricional (TUREK; SMITH, 1996). Essa região contém muitos sítios de ligação para fatores de transcrição celulares, que tem a capacidade de modular sua função positiva ou negativamente (O'CONNOR; BERNARD, 1995). Variações na região LCR podem ser responsáveis por diferenças na patogenicidade de alguns tipos de HPV.

A região L é representada pelos genes das proteínas estruturais L1 (principal proteína) e L2 (proteína secundária). A proteína L1 é altamente conservada e forma os 72 capsômeros. A proteína L2 encontra-se mais internamente e está envolvida na encapsidação do genoma viral, estabilização do capsídeo viral, fuga endossomal

dos vírions e transporte nuclear do genoma do HPV (HORVATH, *et al.*, 2010). A expressão destas proteínas ocorre numa fase mais tardia (ZUR HAUSEN, 1996).

A região precoce E é composta pelas ORF E1, E2, E4, E5, E6 e E7 e são expressas nos estágios iniciais da infecção viral. As proteínas E1 e E2 são fatores de replicação (BODILY; LAIMINS, 2011). A proteína E2, é uma proteína regulatória que ativa ou reprime a transcrição dos genes virais a partir da ligação ao sítio específico no promotor presente na região LCR (VERESS *et al.*, 1999). As proteínas E5, E6 e E7 são consideradas oncoproteínas devido a sua capacidade de transformação celular e estão associadas com a carcinogênese cervical.

E5 é uma proteína hidrofóbica que é encontrada no aparato de Golgi, na membrana plasmática e no retículo endoplasmático (CORTESE *et al.*, 2009) das células infectadas. O mecanismo de ação da proteína E5 ainda não é bem conhecido. Sabe-se que está envolvida na inibição da expressão do complexo de histocompatibilidade (MHC-I e MHC-II) na membrana plasmática (TSAI; CHEN, 2003). Além disso, está envolvida na indução da fusão celular (GAO; ZHEG, 2010), processo presente nos estágios iniciais do câncer cervical. E5 também atua na ubiquitinação da proteína pró-apoptótica, Bax, inibindo assim a apoptose (OH *et al.*, 2010). Além disso, têm sugerido que E5 atua para manter as células em um estado de proliferação competente até a diferenciação, por ativar funções virais tardias (REGAN *et al.*, 2008).

Os genes das proteínas E6 e E7 são expressos em tumores malignos anogenitais. Essas proteínas são capazes de induzir a immortalização de células humanas independentemente, porém, essa capacidade é aumentada quando expressas juntas (MÜNGER *et al.*, 1989). Tais proteínas têm como alvo as proteínas supressoras de tumor, p53 e pRB, respectivamente.

A proteína E6 está envolvida na degradação e inativação da função da proteína celular p53. E6 interage com a proteína p53 através da associação com a proteína E6AP E3 ubiquitina ligase (BODILY *et al.*, 2011; ZUR HAUSEN, 2000). Esse complexo marca a proteína p53 para degradação proteossomal (HUIBREGTSE; SCHEFFNER; HOWLEY, 1993). Para que isso aconteça, é indispensável que E6AP esteja ligado à proteína E6, pois, sozinha, E6AP é incapaz de se ligar e induzir a degradação da p53 (HUIBREGTSE *et al.*, 1993). Muito embora o complexo E6/E6AP seja a via mais conhecida em que a proteína E6 inibe

a atividade da p53, existem outros mecanismos em que E6 atua bloqueando a função dessa proteína. Segundo Thomas *et al.* (1995), a associação de E6 com p53 pode provocar uma mudança conformacional em p53, levando tanto a perda da capacidade de ligação ao DNA quanto causar a dissociação desta proteína ao DNA. E6 pode também causar a retenção de p53 no citoplasma devido a sua ligação ao terminal carboxila de p53 (MANTOVANI *et al.*, 2001). Outro mecanismo seria a interação de E6 com histonas acetiltransferases CBP/p300, pois em condições normais a acetilação de p53 pela p300 aumenta a habilidade de p53 se ligar aos promotores dos genes cujas transcrições são ativadas por ela (ITO *et al.*, 2001). A ligação de E6 a p300 impede a acetilação de p53 (ZIMMERMANN *et al.*, 2000).

Considerada como a principal proteína oncogênica, E7 atua no processo de transformação celular através de sua associação com a proteína supressora de tumor, pRB e com as proteínas tipo pocket, p107 e p130. (DYSON *et al.*, 1992). Estas proteínas regulam a passagem do ciclo celular da fase G1 para a fase S através da modulação da atividade transcricional dos fatores de transcrição E2F (FROLOV; DYSON, 2004). A proteína pRB atua impedindo a progressão do ciclo celular através da sua ligação com o fator de transcrição E2F. Tal complexo é desfeito com a fosforilação de pRB pelo complexo cdk4/6, levando a liberação de E2F que atuará como um ativador transcricional dos genes que estão envolvidos na progressão do ciclo celular (DYSON *et al.*, 1992). Em células infectadas com HPV, a proteína E7 se liga ao complexo pRB-E2F provocando a dissociação do mesmo e a consequente liberação do fator de transcrição E2F (WU *et al.*, 1993), bem como a ubiquitinação de pRB e sua posterior degradação (BOYER *et al.*, 1996).

2.2.1.2 - Ciclo viral

Os Papilomavírus humano apresentam um tropismo por células epiteliais escamosas e infectam células da camada basal. Seu ciclo de vida é dependente da diferenciação das células do hospedeiro – queratinócitos (STANLEY, 2001).

A infecção se inicia com a entrada do vírus nas células da camada basal, as quais ficam expostas devido à microabrasões (Figura 5), porém os sinais iniciais de transcrição do genoma do vírus só aparecem com aproximadamente quatro

semanas após a infecção (BUCK *et al.*, 2005). O HPV estabiliza seu genoma na forma de elementos extracromossomais ou epissomos e utiliza a maquinaria replicativa do hospedeiro para replicar seu material genético. Aproximadamente 50 – 100 cópias de DNA viral estão presentes por célula do hospedeiro (HUMMEL *et al.*, 1992). O genoma viral é replicado juntamente com o DNA do hospedeiro durante a divisão celular (MOODY; LAIMINS, 2010). Nessa camada, ocorre expressão dos genes precoces, regulados pela proteína E2.

Após a divisão celular, o DNA viral é distribuído entre as células filhas. Uma delas abandona a camada basal e migra para a camada superior, a camada suprabasal, onde irá sofrer diferenciação. Nessa fase, as proteínas E6 e E7 desregulam o controle do ciclo celular, estimulando a diferenciação das células. As demais células permanecem na camada basal em constante divisão, permitindo a amplificação do genoma viral em milhares de cópias por células (RUESCH *et al.*, 1998).

Em lesões de baixo grau, o genoma de HPV de alto risco fica presente na forma epissomal, porém durante a progressão para lesão de alto grau, o genoma viral encontra-se integrado ao genoma do hospedeiro (JEON *et al.*, 1995).

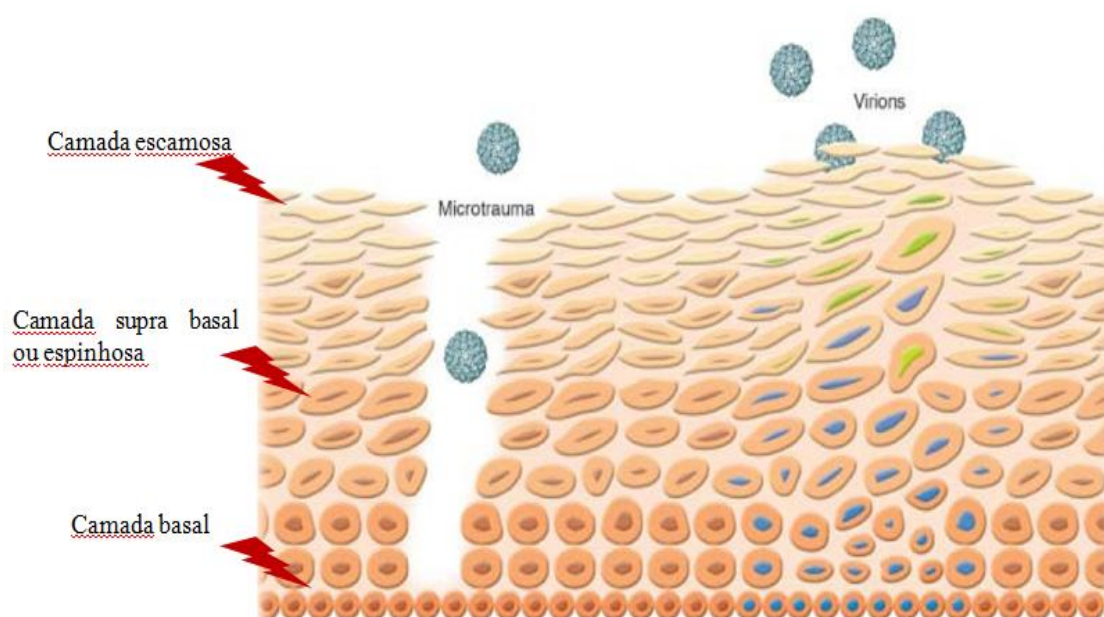


Figura 5: Ciclo de infecção do HPV. O vírus entra através de microlesões. As células com núcleo azulado mostram o estabelecimento do vírus na camada basal. As células com núcleos verdes apresentam expressão dos genes L1 e L2 para a montagem e liberação dos vírions. Fonte: Adaptado de LOWY & SCHILLER (2006).

2.2.1.3 - Integração do HPV e a carcinogênese

O DNA viral pode ser encontrado na célula hospedeira na forma episomal, integrada ou combinada, episomal e integrada. No processo de integração, o DNA viral sofre uma quebra na região do gene E1 e E2 provocando perda da região E1 e ruptura da região E2. Essa quebra leva a perda da função de E2 que é a regulação dos oncogenes E6 e E7. Consequentemente, ocorre uma super expressão desses oncogenes e aumento da proliferação celular (BAKER *et al*, 1987; JEON *et al*, 1995; WAGATSUMA *et al*, 1990; WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007). Vinokurova *et al*. (2008), ao compararem frequência de integração dos HPV de alto risco, 16, 18, 31, 33 e 45 sugeriram que a integração do genoma de HPV oncogênico em lesões do colo uterino é uma consequência e não a causa da instabilidade cromossômica induzida pela perda do controle da expressão dos oncogenes E6 e E7, pois diferentes tipos de HPV provocam instabilidade cromossômica de forma diferente do que é refletida por suas frequências de integração avançadas e o tempo necessário para lesões de alto grau progredirem para câncer invasivo.

2.3 - Fatores que atuam juntamente com HPV no desenvolvimento do câncer cervical

Grande parte das infecções por HPV regridem espontaneamente no decorrer de alguns anos, porém, em alguns poucos casos, as infecções não regridem e, portanto, evoluem para o câncer. Sendo assim, apesar da infecção por HPV ser o principal agente etiológico do câncer cervical, sozinho não é suficiente para o desenvolvimento da doença (CASTLE *et al.*, 2002). Uma série de fatores influencia na persistência da infecção por HPV bem como na progressão das lesões para o câncer cervical.

O comportamento sexual é um dos mais importantes fatores de risco para a infecção pelo HPV. O número de parceiros sexuais é um dos fatores determinantes. Quanto maior o número de parceiros maiores as chances para infecção (BOSCH;

IFTNER 2005; BOSCH; QIAO; CASTELLSAGUÉ, 2006), cuja incidência aumenta com a introdução de novos parceiros (WINER *et al.*, 2003).

As características comportamentais dos parceiros sexuais também estão associadas ao risco de infecção pelo papilomavírus humano. A transmissão e infecção por HPV, como também câncer de pênis e cervical (de suas parceiras) podem ser reduzida pela circuncisão masculina (CASTELLSAGUÉ *et al.*, 2002; NIELSON *et al.*, 2009).

O uso de preservativo pode reduzir o risco de infecção cervical e vulvovaginal por HPV. Segundo Winer *et al.* (2006), casos onde foi detectado HPV em mulheres que afirmaram usar preservativo se devem ao uso incorreto do mesmo. Além disso, o uso regular do preservativo está associado à baixa prevalência de HPV em homens. Usuários consistentes apresentam um risco 60% a 77% menor de infecção com HPV de alto risco (NIELSON *et al.*, 2010).

Outro fator determinante associado à infecção por HPV é a idade (TROTIER; FRANCO, 2006). Estudos mostram que a infecção ocorre com maior frequência em mulheres mais jovens. Dunne *et al.*, (2007) verificaram que entre mulheres com idades de 14 a 39 anos a prevalência do DNA do HPV foi maior (44,8%) na faixa etária entre 20 e 24 anos. O comportamento sexual de mulheres e de seus parceiros juntamente com o início da vida sexual no fim da adolescência é o principal fator determinante do pico de incidência do HPV nessa faixa etária (GONZÁLEZ *et al.*, 2010) o qual decai com o avanço da idade (BOSCH; DE SANJOSÉ, 2007). Estudos mais recentes mostram um aumento no pico de incidência de HPV em mulheres mais velhas e acredita-se que isto se deve ao contato sexual de mulheres ou de seus parceiros com novos parceiros mais tarde na vida ou a mudanças fisiológicas na cérvix devido à idade que contribui para um aumento de infecções vaginais persistentes. Outra possível causa é a re-ativação de infecções latentes relacionadas a mudanças imunológicas e hormonais decorrentes da idade (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

O tabagismo atua também como um fator determinante para infecção cervical por HPV bem como aumenta os riscos de câncer e lesões cervicais de alto grau (CASTLE *et al.*, 2002; DEACON *et al.*, 2000; ROSSEAU *et al.*, 2000). Em pacientes não fumantes HPV16 de alto risco contribui para um aumento do risco em seis vezes comparado com pacientes não fumantes HPV16 negativas. Enquanto que em

pacientes fumantes com HPV16 o risco aumentou em 27 vezes em relação à pacientes fumantes sem HPV (GUNELL, 2007).

O uso de contraceptivo oral está associado à incidência de infecção por HPV. (WINER *et al.*, 2003). Em mulheres HPV positivas que fazem uso prolongado de contraceptivos orais tem risco de desenvolver carcinoma cervical aumentado em até quatro vezes (MORENO *et al.*, 2002) .

Estudos vêm investigando a participação de outras infecções genitais no desenvolvimento de lesões e câncer cervicais. Infecção por *C. trachomatis* tem sido associada à etiologia do câncer cervical invasivo em mulheres HPV positivas (SMITH *et al.*, 2002). *C. trachomatis* inibem apoptose das células do hospedeiro através de mecanismos específicos os quais podem iniciar ou promover a carcinogênese cervical (ANTILLA *et al.*, 2001). Infecções por *C. trachomatis* pode ser uma das causas do carcinoma cervical de células escamosas (KOSKELA *et al.*, 2000). Estudo de Paba *et al.*, (2007) sugeriu que a infecção por *C. trachomatis* favorece a entrada e persistência de vários tipos de HPV de alto risco, levando a integração viral, inibição da apoptose, superexpressão dos oncogenes E6 e E7 e consequentemente à transformação celular. Além disso, infecção por Herpes simples tipo 2 (HSV-2) pode juntamente com o HPV aumentar os riscos de câncer cervical invasivo (PABA *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2002).

Em relação à quantidade de partos realizados, um número elevado destes aumenta de três a seis vezes o risco de câncer cervical (MUÑOZ *et al.*, 2002). Quanto maior o número de partos (acima de cinco) maior o risco de carcinoma de células escamosas na cérvix de pacientes HPV positivas (BOSH; IFTNER, 2005; MUÑOZ *et al.* 2002). Mulheres nulíparas apresentaram um menor risco de carcinoma de células escamosas do que mulheres multíparas (MUÑOZ *et al.*, 2002).

A idade da primeira relação sexual tem sido associada a um aumento no risco de desenvolver lesões e câncer cervicais (PLUMMER *et al.*, 2011; SANJOSE *et al.*, 2008). Quanto mais cedo o início da vida sexual, mais cedo a exposição ao vírus (PLUMMER *et al.*, 2011). O risco aumenta quando o início precoce da vida sexual é seguido de uma gestação (LOUIE *et al.*, 2009).

Além de fatores ambientais, estudos genético-epidemiológicos têm demonstrado que fatores genéticos estão envolvidos na susceptibilidade ao

desenvolvimento de lesões e câncer cervicais (MAGNUSSON; LICHTENSTEIN; GYLLENSTEN, 2000; HERMIMINKI; CHEN, 2006; VINK *et al.*, 2011), sendo responsável por 37% do risco total (VINK *et al.*, 2011). Estudos de riscos familiares para câncer cervical sugerem que efeitos hereditários implicam na existência de genes susceptíveis ao desenvolvimento da doença (HERMMINKI; CHEN, 2006). Assim, muitos genes têm sido apontados como genes candidatos na susceptibilidade e desenvolvimento de lesões e câncer cervicais, dentre eles o gene TP53 bem como aqueles envolvidos na sua via (MAKNI *et al.*, 2000; STOREY *et al.*, 1998) .

2.4 - Via p53

Presente no cromossomo 17, o gene *TP53*, considerado um gene supressor de tumor, apresenta um comprimento de 20 kilobases e está dividido em 11 éxons com tamanhos diferentes (LAMB; CRAWFORD, 1986). Considerado o guardião da integridade do genoma (JIN; LEVINE, 2001), o gene TP53 codifica para uma fosfoproteína de 53 kDa (HARRIS; HOLLSTEIN, 1993; SMITH; FORNACE, 1996), a p53, a qual apresenta uma capacidade de se ligar a sequências específicas no DNA e ativar ou reprimir a transcrição de genes adjacentes atuando assim como um fator transcricional de muitos genes em resposta a vários sinais de estresse ou danos na célula (HARRIS; LEVINE, 2005).

A proteína p53 é um inibidor do crescimento celular, pois induz a parada do ciclo celular (CROOK *et al.*, 1994; MERCER *et al.*, 1990) e ativação do processo de apoptose (BATES; VOUSDEN, 1996). A ativação de p53 impede erros durante a duplicação celular, contribui para a integridade da divisão da célula, mantendo assim a estabilidade genética através da interrupção da progressão do ciclo celular, além de ser importante na produção de matriz extracelular, citoesqueleto e secreção de proteínas (NAKANO *et al.*, 2000; RILEY *et al.*, 2008; VOLGELSTEIN *et al.*, 2000).

A proteína p53 é ativada através de modificações pós-traducionais, como adição ou remoção de grupos fosfato, acetil, glicosil, ribose, ubiquitina (VOLGELSTEIN *et al.*, 2000) que leva a uma parada do ciclo celular, direcionando

para a senescência ou apoptose celular (HARRIS; LEVINE, 2005), impedindo que um erro ou dano no DNA possa se propagar entre as células.

A transcrição de genes mediada ou reprimida pela p53 depende do tipo do sinal de estresse, das modificações da proteína e que proteínas estão associadas a ela (HARRIS; LEVINE, 2005). Dentre os sinais de estresse estão o dano no DNA, como o encurtamento do telômero, hipoxia, danos no fuso mitótico, choque térmico, biogênese ribossomal inadequada, ativação de oncogenes por mutação, depleção de rNTP, óxido nítrico (HARRIS; LEVINE, 2005; MORRISON *et al.*, 2003; RILEY *et al.*, 2008) (Figura 6).

Cada sinal de estresse ativa diferentes enzimas as quais modificam diferentes resíduos de aminoácidos em p53. As modificações causadas em p53 podem aumentar a sua meia-vida na célula provocando um aumento de sua concentração e provocam uma alteração na sua habilidade de se ligar ao DNA aumentando assim a transcrição de genes que são regulados pelas sequências desta molécula (HARRIS; LEVINE, 2005).

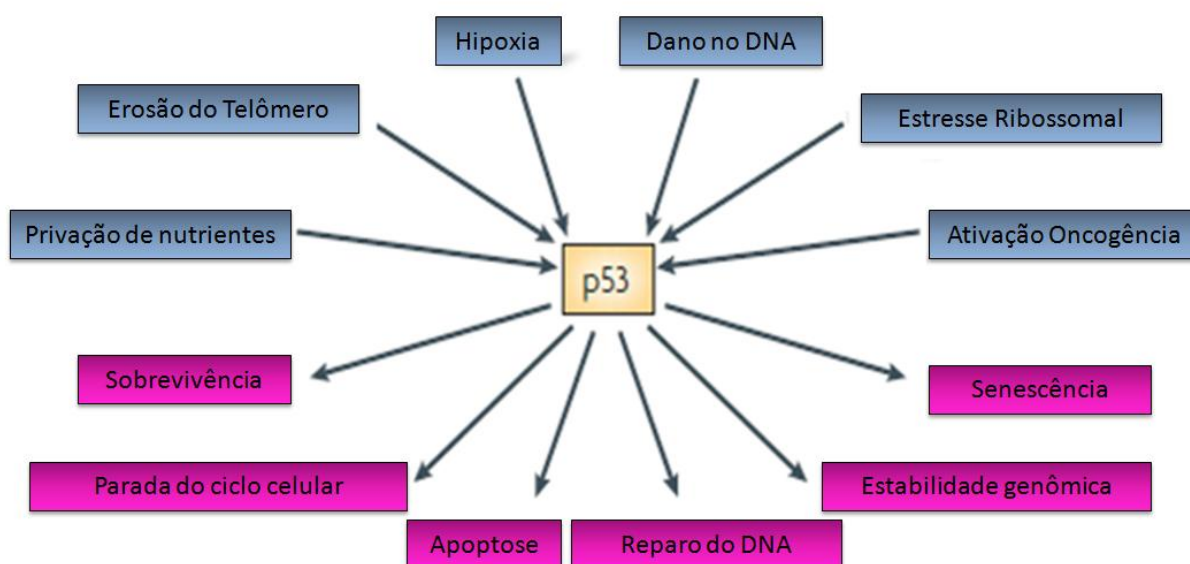


Figura 6: Ativação e função da p53. Os diferentes papéis desempenhados pela p53 nas respostas celulares (lilás) a diferentes tipos de estresses (azul). Adaptado de VOUSDEN; LANE (2007).

A proteína p53 reconhece sequências no DNA para estabelecer sua ligação. Essas sequências são chamadas de Elementos de resposta - RE. A proteína p53 se

liga nessas sequências e promove o processo transcricional (RILEY *et al.*, 2008). Tais elementos são compostos de RRRCWWGYYY, em que R consiste de uma purina, W de uma adenina ou timina, e Y de uma pirimidina (HARRIS; LEVIN, 2005). p53 contém um domínio de ligação ao DNA sequencia-específica na região central e um domínio de ativação transcricional no N-terminal, além disso apresenta um sinal de localização nuclear, um domínio de tetramerização e um domínio regulatório na extremidade c-terminal (XU, 2003).

A proteína p53 utiliza de dois mecanismos para desencadear a resposta apoptótica (GENG *et al.*, 2010). O primeiro ocorre através da ligação ao DNA ativando a expressão de genes pró-apoptóticos, enquanto o segundo ocorre no citosol, independente de transcrição, através da interação direta com proteínas da família BCL2 presentes nas mitocôndrias (CHIPUK *et al.*, 2005). Esta interação cria poros na membrana (alteração do potencial de membrana) da mitocôndria levando a liberação do citocromo c e em seguida apoptose (WHIBLEY; PHAROAH; HOLLSTEIN, 2009; VOUSDEN; LANE, 2007). Assim, p53 pode atuar tanto no núcleo como no citoplasma (SPIDEL, 2010).

A atividade de p53 é modulada através de uma rede de proteínas que a regulam positiva e negativamente. O principal regulador negativo de p53 é a proteína Mdm2 (HAUPT *et al.*, 1996). Mdm2 inibe a atividade de p53 adicionando monômeros de ubiquitina nos resíduos de lisina de p53 para que a mesma seja degradada pelo sistema proteossomal (DESHAIES *et al.*, 2009). Um outro regulador negativo de p53 é a proteína Mdm4. Mdm4 modula p53 indiretamente através da interação com Mdm2 formando heterodímeros. Além disso, estimula Mdm2 na ubiquitinação de p53 (MARINE *et al.*, 2006). A atividade de Mdm2 é inibida por sua vez, pela proteína p14/19 ARF, aumentando assim, os níveis de p53 na célula (Figura 7).

A transcrição do gene de p14/19 ARF é induzida por E2F-1 e reprimida pela p53. A atividade de Mdm2 é inibida também pela ligação da proteína de retinoblastoma, pRb. Tal ligação contribui com o aumento dos níveis de p53. Tanto a pRb quanto Mdm2 são fosforiladas e conseqüentemente inibidas pela atividade da ciclina E-quinase 2 (HARRIS; LEVINE, 2005). Além disso, a ativação de p53 estimula a transcrição do gene *WAF1*, que codifica para a proteína p21. A proteína

p21 atua inibindo a atividade ciclinaE-quinase2 (HARPER *et al.*, 1993). A figura 8 resume o mecanismo de ação da p53.

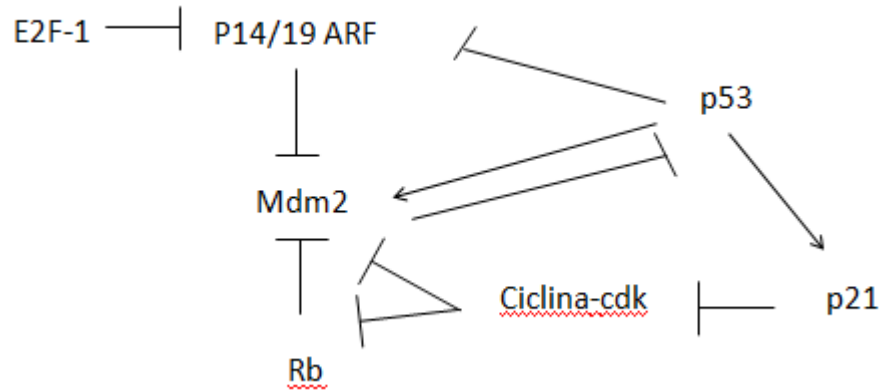


Figura 7: Regulação positiva e negativa da p53. p53 ativa a transcrição de Mdm2 que por sua vez bloqueia a atividade de p53 através da regulação negativa. A atividade de Mdm2 é inibida pela p14/19 ARF a qual é estimulada por E2F-1 e inibida por p53. p53 ativa a expressão do gene WAF1, cujo produto interage com o complexo ciclina-cdk bloqueando sua atividade. Ciclina-cdk interage com Mdm2 e Rb. Fonte: AUTORA

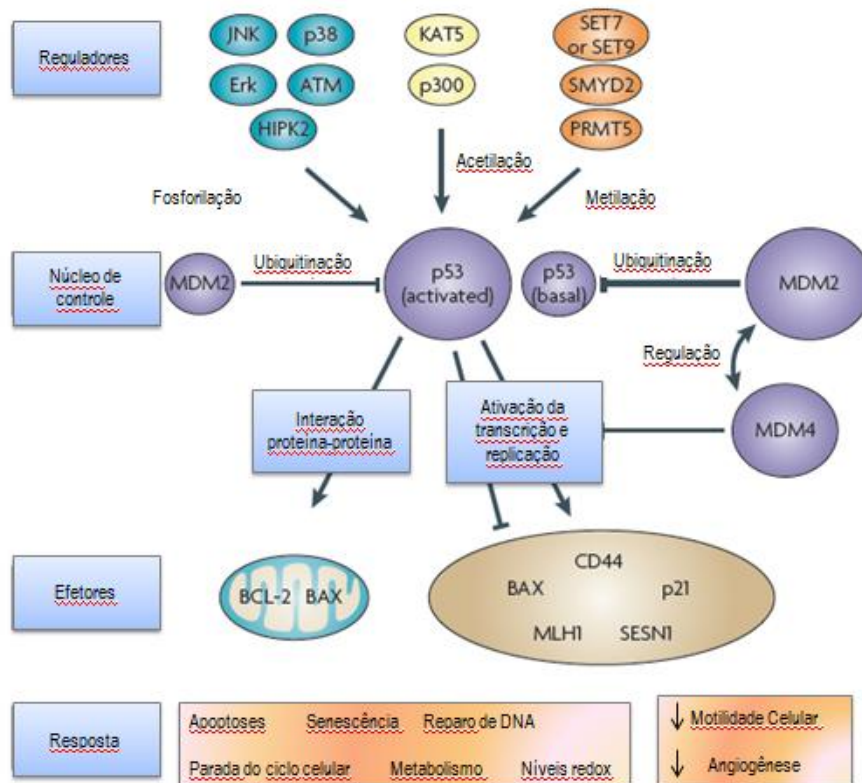


Figura 8: Mecanismo de ação da via p53. Proteínas reguladoras ativadas por diferentes tipos de estresse celular modulam a atividade de p53 através da fosforilação, acetilação e metilação. p53 ativa ou reprime a transcrição de genes e interação proteína-proteína para induzir apoptose, parada do ciclo celular, senescência. Adaptado de WHIBLEY; PHAROAH; HOLLSTEIN (2009).

2.4.1. Gene *MDM2*

Localizado no braço longo do cromossomo 12q15 (Figura 9), o gene Murine Double Minute 2 (*MDM2*) codifica para a principal proteína reguladora negativa de p53, a mdm2 (WADE *et al.*, 2010). Inicialmente identificado devido a sua amplificação espontânea na linhagem celular de camundongo BALB/c (FAKHARZADEH; TRUSKO; GEORGE, 1991), quando superexpresso, aumenta o potencial tumorigênico das células. O produto do gene, a proteína mdm2, forma um complexo com p53 e inibe sua função de trans-ativação (MOMAND *et al.*, 1992).

A proteína mdm2 pode inibir a função de p53 de duas maneiras. Agindo como uma E3 ubiquitina ligase, mdm2 ubiquitina a p53 para que seja degradada através do processo proteossomal (HAUPT *et al.*, 1997). Outro mecanismo pelo qual mdm2 inibe a função de p53 é através da ligação ao domínio de ativação transcricional amino terminal inibindo a habilidade de p53 atuar na regulação gênica (HAUP *et al.*, 1997) mascarando o acesso para a maquinaria transcricional.

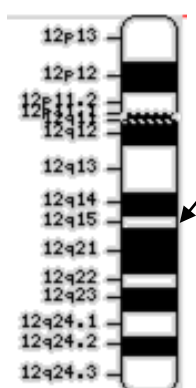


Figura 9: Cromossomo 12. Locus do gene *MDM2* localizado na posição 12q15.

Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov.

A proteína mdm2 estimula a progressão do ciclo celular se ligando também a proteína supressora de tumor, pRB. Dessa forma, inibe a função supressora de crescimento desta proteína. Além disso, mdm2 também interage com o fator de transcrição E2F1. Esta interação estimula a atividade de E2F1, ativando genes envolvidos na progressão da fase G1 para a fase S (LOZANO; LUNA, 1998).

2.4.1.1 - Polimorfismo T309G no gene *MDM2*

O polimorfismo T309G ocorre no primeiro íntron do promotor do gene *MDM2*. O polimorfismo T309G consiste na substituição de T por G no nucleotídeo 309 do íntron 1 do promotor de *MDM2*. A região promotora de *MDM2* apresenta vários sítios de ligação para o fator de transcrição Sp1 (Figura 10). Tal fator é responsável por ativar a transcrição de *MDM2*. O ponto exato do polimorfismo (troca do T/G) ocorre na extremidade do último sitio de ligação para Sp1. Essa variação aumenta a afinidade de Sp1 pelo promotor de *MDM2*, elevando assim, os níveis de expressão desse gene, e como consequência, aumento exacerbado nos níveis da proteína mdm2 na célula. Isso resulta na incapacidade de estabilização de p53 em resposta a um dano no DNA. Assim, a atividade supressora de tumor da p53 é atenuada, o que contribui para o desenvolvimento tumoral em humanos (BOND *et al.*, 2004).

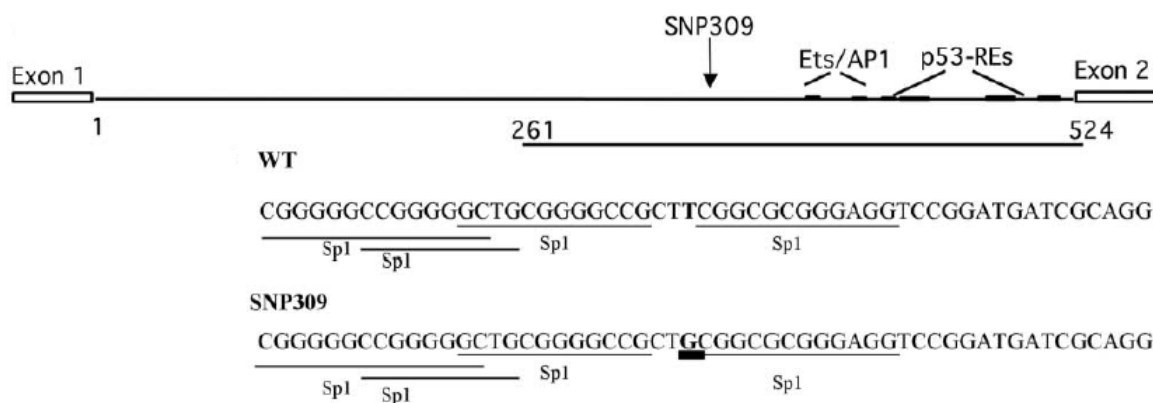


Figura 10: Esquema da região intrônica do gene *MDM2*. A seta mostra a região do promotor onde se encontra o polimorfismo SNPT309G. Os sítios para Sp1 dentro na região intrônica estão sublinhados. Adaptado de BOND *et al.* (2004).

Estudos de tumores de mama têm demonstrado que a maneira como o SNP309 influencia na transcrição do gene *MDM2* e formação de tumor, depende tanto da via de sinalização de estrogênio, quanto do estresse ambiental e genética do tumor (BOND; LEVINE, 2007). Quando a via de sinalização do estrogênio está ativa na presença do SNP309, os níveis basais de mdm2 na célula são elevados, devido ao aumento da afinidade do fator de transcrição Sp1 pelo sítio criado na região

promotora. Assim, pessoas portadoras do alelo G SNP309 apresentam uma resposta (apoptose e parada do ciclo celular) ao estresse celular (cigarro e infecção crônica por hepatite C) muito baixa devido à diminuição nos níveis de p53 (Figura 11) (BOND; LEVINE, 2007).

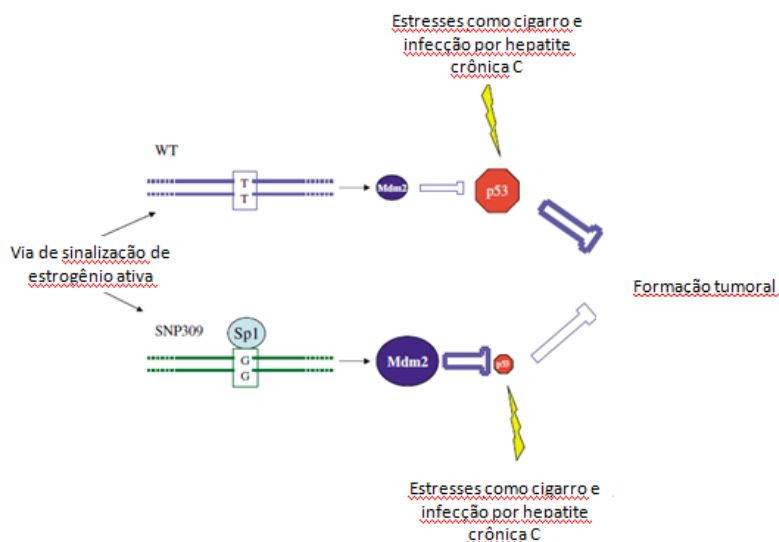


Figura 11: Modelo proposto para interação do SNP309 de MDM2 com hormônios e estresse ambiental. A presença do SNPT309G aumenta a afinidade por Sp1 elevando os níveis de mdm2 na célula e consequentemente atenuação da função supressora de tumor da proteína p53 em resposta a estresses ambientais sofridos pela célula. Adaptado de BOND; LEVINE (2007).

Muitos estudos têm sido feitos para avaliar a associação deste polimorfismo com a susceptibilidade a diversos tipos de tumores como de próstata (STOEHR *et al.*, 2008), mama (BOERSMA *et al.*, 2006; WASIELEWSKI, *et al.*, 2007), pulmão (PINE *et al.*, 2006), fígado (DHAREL *et al.*, 2006), rim (HIRATA *et al.*, 2007). Porém, existem poucos estudos que avaliam a associação este polimorfismo com o câncer cervical.

Recentemente, Nunobiki *et al.*, (2010) investigaram a relação desse polimorfismo na carcinogênese cervical e sugeriram uma forte associação na população japonesa infectada por HPV de alto risco. No entanto, a associação de SNP309 com o câncer cervical ainda é controverso. Os achados de Meissner *et al.*, (2007) sugeriram SNP309 não deve ser uma fator de risco para o câncer cervical.

2.4.2 - Gene *WAF1*

O gene *WAF1* ou *CDKN1A* localizado no cromossomo 6 (6p21.1) (Figura 12) codifica para uma proteína de 21 kD – p21. Regulado pela p53, o gene *WAF1* é um componente importante da via p53 supressora de tumor (EL-DEIRY *et al.*, 1993). Sua expressão é ativada pela p53 em resposta a algum dano no DNA resultando na retenção do ciclo celular na fase G1.

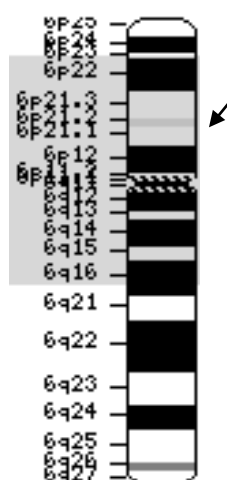


Figura 12: Cromossomo 6. Locus do gene *MDM2* localizado na posição 6p21.1. Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov.

A principal função da proteína p21 é a ligação e inibição da atividade quinase das CDK (quinases-dependentes de ciclina) (HARPER *et al.*, 1993). A ligação de p21 ao complexo ciclina-cdk induz uma parada no ciclo celular no estágio G1. A interação com a ciclina ocorre no motivo conservado Cy1 na metade N-terminal e no motivo Cy2 na metade C-terminal. A interação com as quinases ocorre no sítio de ligação de CDK no N-terminal. p21 interrompe a interação entre CDK e seus substratos, as proteínas retinoblastomas (pRB), através dos motivos semelhantes a Cy (ABBAS; DUTTA, 2009).

O complexo ciclina-cdk atua fosforilando algumas proteínas supressoras de tumor, como as da família do retinoblastoma (RB). Tal fosforilação permite que o fator de transcrição E2F1 complexado à pRB seja liberado para ativar a transcrição

de genes envolvidos na fase S (HARPER *et al.*, 1993), induzindo assim a progressão do ciclo celular.

A proteína p21 também inibe a progressão do ciclo celular interagindo com a proteína antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) através de seu domínio C-terminal. Tal ligação inibe a atividade da DNA polimerase dependente de PCNA. Assim, a replicação do DNA é inibida e os processos de reparo dependentes de PCNA são modulados. Portanto, a p21 pode inibir a progressão do ciclo celular através mecanismos independentes e simultâneos (LUO *et al.*, 1995). Além disso, a p21 possui uma capacidade intrínseca de associação com subunidades de E2F, regulando a transcrição de genes dependentes de E2F e controlando assim, o crescimento celular. Tal atividade ocorre através de uma via independente de pRB (DELAVALINE; THANGUE, 1999). Além do fator E2F, p21 também pode se ligar diretamente aos fatores de transcrição STAT3 e MYC, inibindo a atividade transcricional destes fatores (Figura13) (ABBAS; DUTTA, 2009).

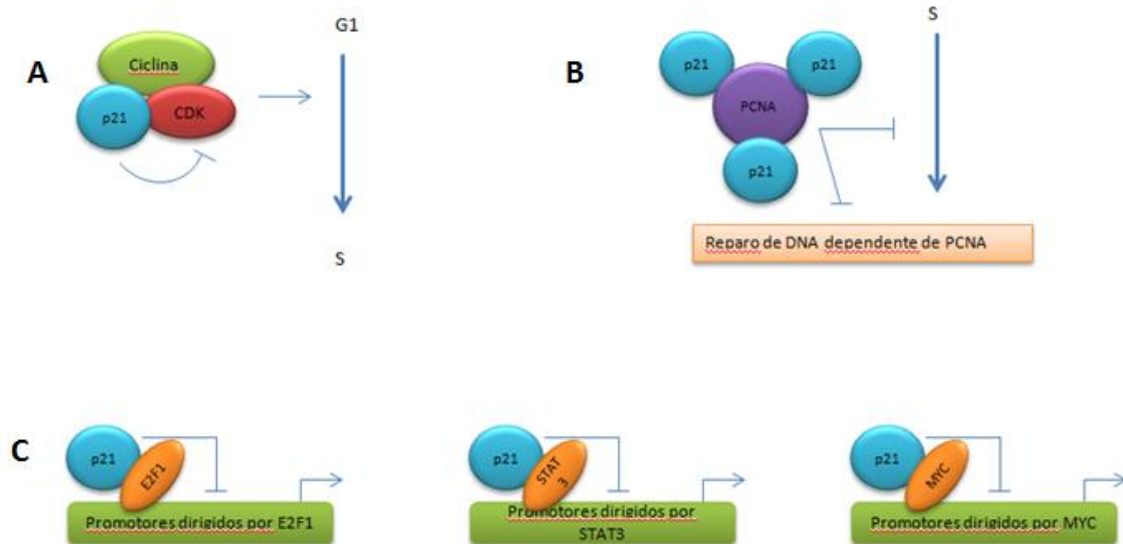


Figura 13: Mecanismos de ação de p21. Em A) p21 interage com o complexo ciclina-cdk provocando a parada do ciclo celular na fase G1. B) Várias moléculas de p21 se ligam a PCNA inibindo a atividade da polimerase dependente de PCNA impedindo a síntese e reparo de DNA. C) p21 se liga aos fatores de transcrição E2F-1, STAT e MYC inibindo suas atividades. Adaptado de Abbas e Dutta (2009).

2.4.2.1 - Polimorfismo C590T no Gene WAF1

O polimorfismo C590T é uma substituição de uma citosina (C) por uma timina (T) no nucleotídeo 590 do códon 55 localizado 20 nucleotídeos à montante (downstream) do códon de parada no éxon 3, presente na região não traduzida 3'UTR (KONISHI *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2003) do gene *WAF1*.

Regiões 3'UTR são importantes na estabilidade do mRNA, regulação gênica e crescimento celular (RASTINEJAD *et al.*, 1993). Polimorfismos na região 3'UTR do éxon 3 do gene *WAF1* tem mostrado estar envolvido na alteração da estabilidade da proteína p21, funcionamento do ciclo celular, bem como no desenvolvimento de câncer. A associação desse polimorfismo com diversos tipos câncer tem demonstrado resultados controversos (KIBE *et al.*, 2003; KONISHI *et al.*, 2000; MA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006).

Rodrigues *et al.* (2003) sugeriram que polimorfismo 3'UTR de p21 não apresenta nenhum efeito sobre a susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores. No entanto, Facher *et al.* (1997) demonstraram que a presença do polimorfismo na região 3'UTR do gene *WAF1* está aumentada em adenocarcinoma de próstata e em carcinoma de células escamosas de pescoço e cabeça. Ma *et al.* (2006) demonstraram que a presença do polimorfismo está associado com o aumento do risco de desenvolver câncer de mama na população chinesa.

Diante disto, acredita-se que infecção por HPV juntamente com a presença de polimorfismos em genes envolvidos na via da proteína p53 podem aumentar a susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões cervicais.

3 – OBJETIVOS

3.1 - Geral

Avaliar a possível associação de polimorfismos nos genes *MDM2* e *WAF1* com a susceptibilidade a lesões cervicais de baixo e alto graus em pacientes infectadas com HPV.

3.2 – Específicos

1 – Caracterizar a mostra estudada de acordo com os aspectos clínicos-biológicos.

2 - Verificar a possível associação do polimorfismo T309G no gene *MDM2* com lesões cervicais de baixo (LSIL) e alto (HSIL) graus em pacientes infectadas com HPV comparadas com o grupo controle.

3 - Verificar a possível associação do polimorfismo SNPC590T no gene *WAF1* com lesões cervicais de baixo (LSIL) e alto (HSIL) graus em pacientes infectadas com HPV comparadas com o grupo controle.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Casuística

No presente trabalho foi realizado um estudo analítico transversal com comparação de grupos. No total, foram coletadas para este estudo 184 amostras de pacientes oriundas do setor de oncologia ginecológica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) - Pernambuco e do Centro de Medicina Integrada de Sergipe (CEMISE) – Sergipe. A seleção das pacientes ocorreu de forma aleatória.

Como critérios de inclusão no estudo foram admitidas mulheres positivas para infecção por HPV através do teste de Papanicolaou. No grupo de casos foram admitidas pacientes portadoras de lesões cervicais (HSIL, LSIL) e que foram positivas para a detecção do DNA de HPV. Foram admitidas como controles as pacientes que eram positivas para infecção por HPV, mas que não eram portadoras de lesões cervicais.

Os critérios de exclusão da pesquisa foram: presença de lesões cervicais e ausência de HPV, ausência tanto de lesões cervicais como da infecção por HPV, presença do vírus HIV e amostras de câncer cervical, por se tratar de um número bastante reduzido (apenas 6 amostras).

As amostras foram coletadas após aprovação do comitê de ética (HUOC/PROCAPE 64/2010) e todas as pacientes assinaram o termo de livre consentimento. Além disso, as pacientes envolvidas neste estudo responderam ao questionário de estudo durante consulta ginecológica (Anexo9.1).

4.2 – Criação de banco de dados

O questionário aplicado às pacientes foi estruturado e digitado em um banco de dados no Microsoft Excel, onde foram inseridas todas as informações referentes ao perfil social, sexual, comportamental, familiar, citológico, histológico, tipo de

infecção viral bem como o perfil genético de todas as pacientes arroladas neste estudo.

4.3 – Obtenção da Amostra

As pacientes foram submetidas à coleta do esfregaço do colo do útero, para futura detecção viral bem como à coleta por punção venosa à vácuo do sangue periférico para estudo de genotipagem dos polimorfismos.

Após a coleta do esfregaço com escova ginecológica (cytobrush), a mesma foi quebrada e acondicionada em tubos de polietilenos contendo solução tampão fosfato-salino (PBS) e levadas ao laboratório onde foram estocadas em -20 °C para posterior processamento.

As pacientes foram então solicitadas a doarem uma amostra de sangue, a qual consistiu de aproximadamente 5 ml de sangue periférico colhida por punção venosa.

4.4 – Extração do DNA, Detecção e Tipificação do DNA Viral

O DNA das amostras foi previamente extraído utilizando-se o *GenomicPrep Blood DNA isolation kit (Amersham Bioscience)* de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram também submetidas à detecção de Papilomavírus humano através da técnica da PCR (*polymerase chain reaction – reação em cadeia da polimerase*) convencional, baseada na amplificação do gene codificador da L1 usando *primers* consenso e degenerados (MY09/MY11) (Tabela 2). Em seguida foram realizadas reações de amplificação para a tipificação de HPV utilizando *primers* específicos para os HPV 16, 18, 31 e 33 (Tabela 2). As amostras foram submetidas ao sequenciamento automático para confirmação da presença e do tipo de HPV pelo método dideoxi-terminal fluorescente, utilizando o kit *ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction* (Applied Biosystems®), através da colaboração com a plataforma multiusuária de

sequenciamento e análise de expressão gênica do CCB-UFPE e FIOCRUZ – Aggeu Magalhaes, utilizando o sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystem®), de acordo com os padrões estabelecidos nesta unidade.

Tabela 2 - Primers utilizados para detecção e tipificação do Papilomavirus humano (Adaptado de KARLSEN *et al.*, 1996).

Tipo	Primer	Sequência do Primer (5'- 3')	Fragmento gerado (pb)
HPV	MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	445-499
HPV	MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	445-499
HPV 16	Pr1	TCAAAAGCCACTGTGTCC TGA	119
	Pr2	CGTGTTCTTGATGATCTGCAA	
HPV 18	Pr1	CCGAGCACGACAGGAACGACT	172
	Pr2	TCGTTTTCTTCCTCTGAGTCGCTT	
HPV 31	Pr1	CTACAGTAAGCATTGTGCTATGC	153
	Pr2	ACGTAATGGAGAGGTTGCAATAACCC	
HPV 33	Pr1	AACGCCATGAGAGGACACAAG	211
	Pr2	ACACATAAACGAACTGTGGTG	

4.5 - Análise Genética

4.5.1 – Genotipagem do polimorfismo T309G de *MDM2*

A genotipagem do polimorfismo T309G do gene *MDM2* foi realizada através da amplificação pela técnica de PCR, seguida de digestão enzimática do produto amplificado.

Para a reação de PCR foram utilizados: 50 ng de DNA genômico, 20 pmol de cada oligonucleotídeo (Tabela 3), 0,1 mM de cada dNTP, tampão 1x (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl e 0,1% Triton X-100), 1 mM MgCl₂ e 1 unidade de Taq polymerase.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador Biocycler MG96+ nas seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos para a desnaturação inicial do

material genômico, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 66,5°C por 40 segundos, 72°C por 45 segundos para amplificação do segmento gênico de interesse e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos para a extensão final do fragmento. O produto da amplificação foi digerido com enzima de restrição PstI à 37°C por 16 horas. Em seguida, o produto foi analisado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os tamanhos dos fragmentos gerados relacionados com o genótipo estão ilustrados esquematicamente na figura 14.



Figura 14: Representação esquemática do polimorfismo T309G do gene *MDM2* após amplificação e digestão com enzima PstI.

4.5.2. Genotipagem do polimorfismo SNPC590T de *WAF1*

A genotipagem do polimorfismo C590T do gene *WAF1* foi realizada por meio da técnica de RFLP, que consiste de amplificação de fragmentos de DNA por PCR seguida de digestão enzimática.

A reação de PCR foi realizada utilizando: 50 ng de DNA genômico, 20 pmol de cada oligonucleotídeo (Tabela 3), 0,1 mM de cada dNTP, tampão 1x (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl e 0,1% Triton X-100), 1 mM MgCl₂ e 1 unidade de Taq polymerase.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador Biocycler MG96+ nas seguintes condições: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos para a desnaturação inicial do material genômico, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 66°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto para amplificação do segmento gênico de interesse e 1 ciclo de 72°C por 5

minutos para a extensão final do fragmento. O produto da amplificação foi digerido com enzima de restrição PstI à 37°C por 16 horas. Em seguida, o produto foi analisado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os Fragmentos gerados e correlacionados com o genótipo estão esquematicamente ilustrados na figura 15.

Tabela 3: Relação dos oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para análise dos polimorfismos.

GENE	POLIMORFISMO	OLIGONUCLEOTÍDEO	AUTOR
<i>WAF1</i> (<i>p21</i>)	SNPC590T	5'-CCCAGGGAAGGGTGTCTG-3' 5'-GGGCGGCCAGGGTATGTAC-3'	Santos <i>et al.</i> (2006)
<i>MDM2</i>	SNPT309G	5'-GATTTCGGACGGCTCTCGCGGC- 3' 5'-CATCCGGACCTCCCGCGCTG-3'	Ma <i>et al.</i> (2006)

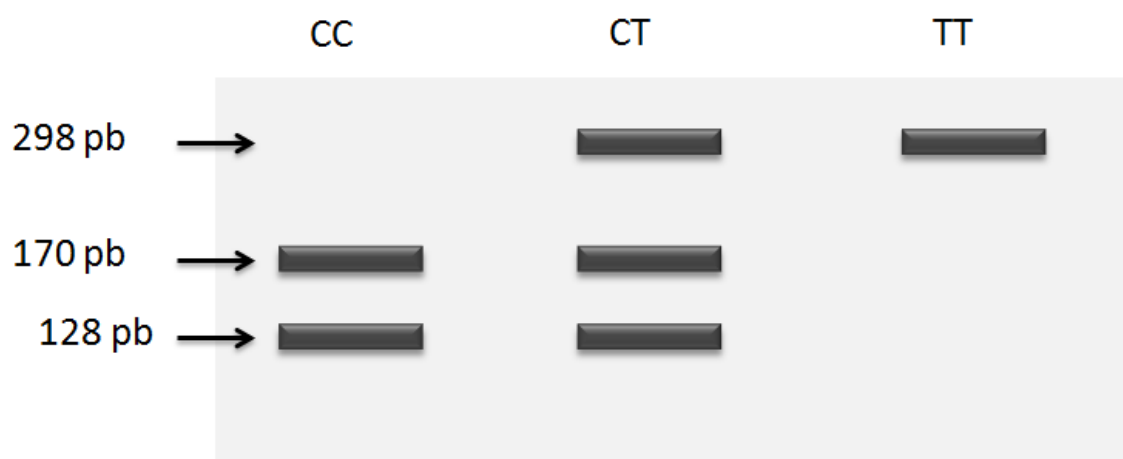


Figura 15: Representação esquemática do polimorfismo C590T do gene WAF1 após amplificação e digestão com enzima PstI.

4.6. Análise Estatística

4.6.1. Dados sócio-demográficos

Para a análise das características sócio-demográficas foi realizado teste de qui-quadrado de Pearson (χ^2). Para valores em cada casela da tabela de contingência inferiores a 10 foi utilizado teste G de aderência. Para tal, foi utilizado o programa BioEstat versão 5.0.

4.6.2 - Polimorfismos

Tanto as frequências dos alelos como dos diferentes genótipos foram testadas para verificar se estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg através do programa Genotype Transposer versão 1.0.

Para verificar a possível associação dos polimorfismos com o desenvolvimento das lesões cervicais foi utilizado o programa R versão 2.13.0. Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos foram calculadas pela contagem direta. O teste exato de Fisher foi usado para avaliar diferenças entre proporções. O risco relativo foi expresso em termo de “odds ratios” (OR) e intervalo de confiança de 95% (95% CI). Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

5.1 – Caracterização da Amostra

5.1.1 - Análise da amostra total

Analisando toda a amostra de pacientes participantes do estudo, observou-se que a média da idade das pacientes foi de $37 \pm 11,05$ anos. A faixa etária entre 10 e 29 anos foi a mais frequente (31%, 27 pacientes), seguida da faixa etária entre 30 a 39 anos (27%, 23 pacientes) e da faixa etária entre 40 a 49 anos (27%, 23 pacientes) e por último a faixa etária entre 50 a 59 anos (15%, 13 pacientes) Figura 16.

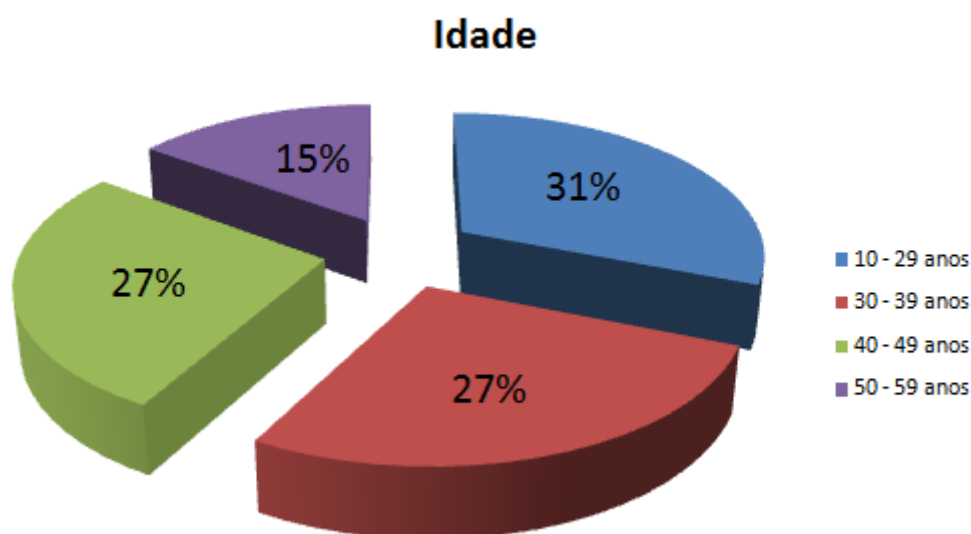


Figura 16 – O gráfico mostra a frequência das pacientes nos diferentes grupos etários. Em azul, pacientes com idades entre 10 e 29 anos, 31%. Em vermelho, pacientes com idades entre 30 e 39 anos, 27%. Em verde, pacientes com idades entre 40 e 49 anos de idade, 27%. Em roxo, pacientes entre 50 e 59 anos de idade.

Do total, 78% das pacientes declararam não serem fumantes, 16% atualmente fumam e 6% foram fumantes. Figura 17.

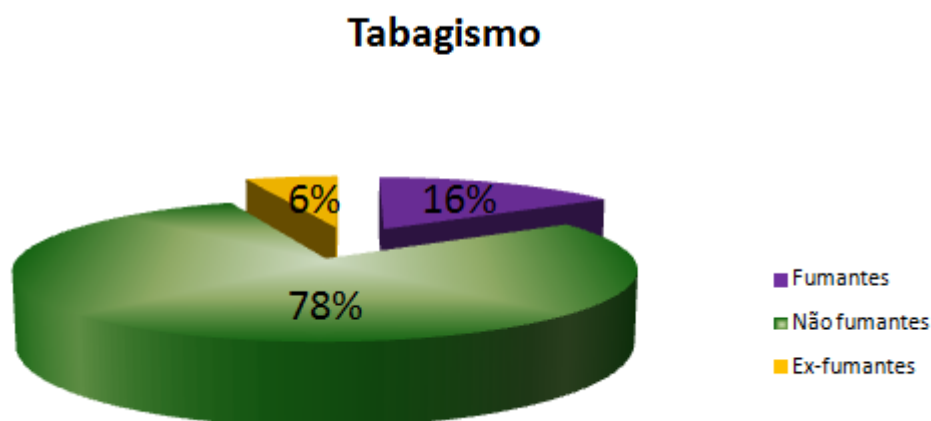


Figura 17 – Grupo de pacientes dividido em não fumantes, fumantes e ex-fumantes. Em verde, percentagem das pacientes não fumantes, 78%. Em roxo, percentagem das pacientes fumantes, 16% e em amarelo, a percentagem das ex-fumantes, 6%.

Em relação à etnia, 36 pacientes são pardas (42,35%), 31 pacientes (36,47%) são brancas, 15 pacientes (17,74%) são negras e 3 pacientes (3,52%) são da cor amarela. Com relação à idade da primeira relação sexual, 67 pacientes (65%) declararam ter iniciado a vida sexual entre 15 e 20 anos, 15 pacientes (14,56%) após os 21 anos e 21 pacientes (20,38%) antes dos 14 anos. Figura 18.

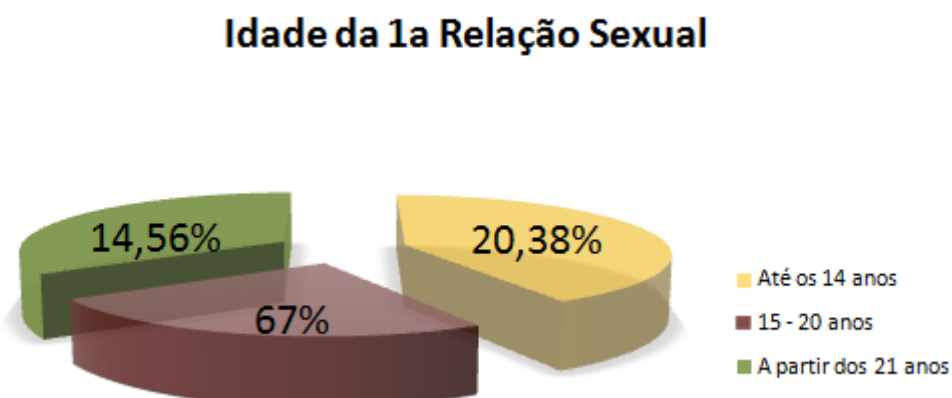


Figura 18 – Percentagem das pacientes em relação à Idade da 1ª relação sexual. Em amarelo pacientes que iniciaram a vida sexual até os 14 anos, 20,38%. Em marrom pacientes que iniciaram a vida sexual entre 15 e 20 anos, 67%. Em verde, pacientes que tiveram a primeira relação sexual depois dos 21 anos de idade, 14,56%.

Quanto ao número de parceiros, 60 pacientes (67%) afirmaram ter tido até dois parceiros e 30 (33%) haviam tido três ou mais parceiros (variando de três a mais de dez). Figura 19.

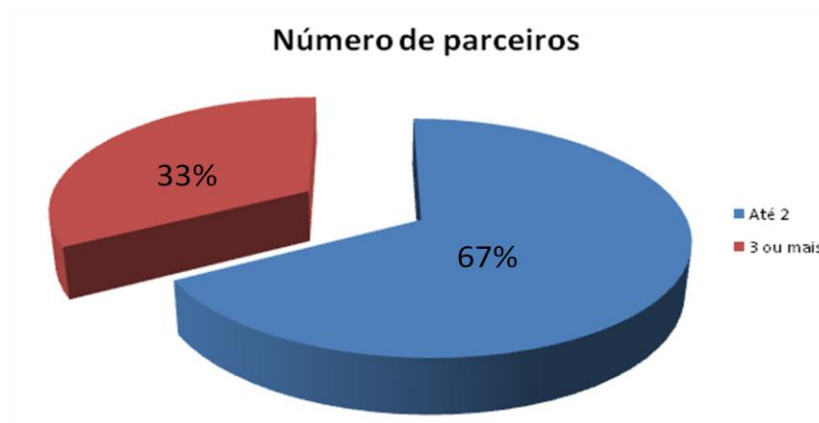


Figura 19 – Percentagem das pacientes em relação ao número de parceiros sexuais. Em azul pacientes que tiveram até 2 parceiros sexuais, 67%. Em vermelho pacientes que tiveram 3 ou mais parceiros sexuais, 33%.

A maioria das pacientes 54 (67,5%) relatou não fazer uso de preservativos enquanto que apenas 26 (32,5%) afirmaram fazer uso do mesmo. Figura 20.

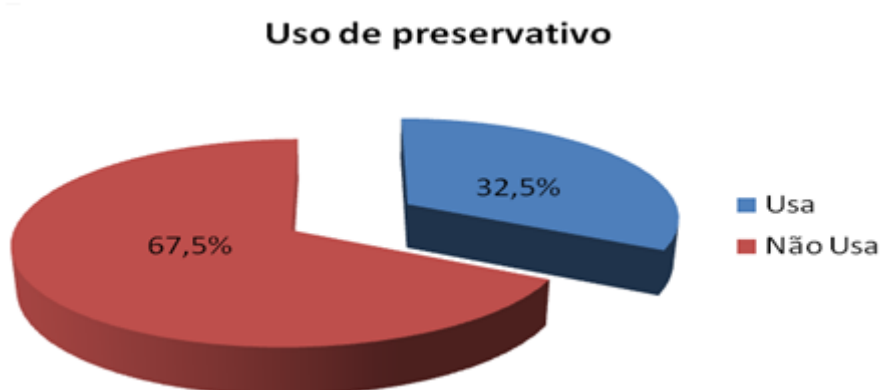


Figura 20 – Percentagem das pacientes em relação ao uso de preservativos. Em azul pacientes usam preservativo, 32,5%. Em vermelho pacientes que não usam preservativo, 67,5%.

Em relação ao uso de anticoncepcional, apenas 22 (24%) pacientes faziam uso enquanto 70 (76%) não usavam. Figura 21.



Figura 21 – Percentagem das pacientes em relação ao uso de anticoncepcional. Em laranja escuro pacientes que usam anticoncepcional, 24%. Em laranja claro pacientes que não usam anticoncepcional, 76%.

Em relação ao número de partos, 59 pacientes (75%) tiveram 1 ou 2 partos e 20 pacientes (25%) tiveram mais de 3 partos. Figura 22.

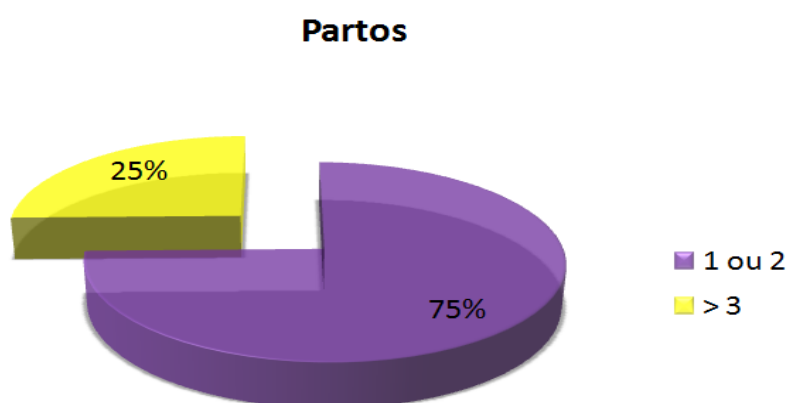


Figura 22 – Percentagem das pacientes em relação ao número de partos. Em amarelo pacientes que tiveram mais de 3 partos, 25%. Em roxo, pacientes que tiveram de 1 a 2 partos, 75%.

Com relação ao estado civil, 25 pacientes (28%) são solteiras, 58 (66%) casadas, 4 (5%) viúvas e apenas 1 (1%) divorciada. Figura 23.

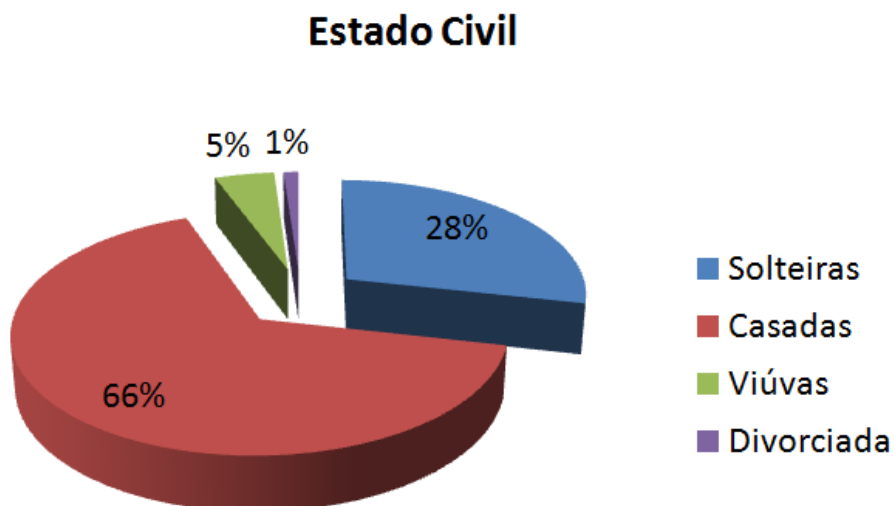


Figura 23 – Percentagem das pacientes em relação ao estado civil. Em vermelho, pacientes casadas, 66%. Em azul, pacientes solteiras, 28%. Em verde, pacientes viúvas, 5% e em roxo, pacientes divorciadas, 1%.

Entre as pacientes HPV positivas, 40 (44%) são infectadas pelos HPV tipo 16, 11% infectadas com HPV 31 e 45% infectadas com outros tipos de HPV (6,11 53, 58, 61, 70, 81). Figura 24.

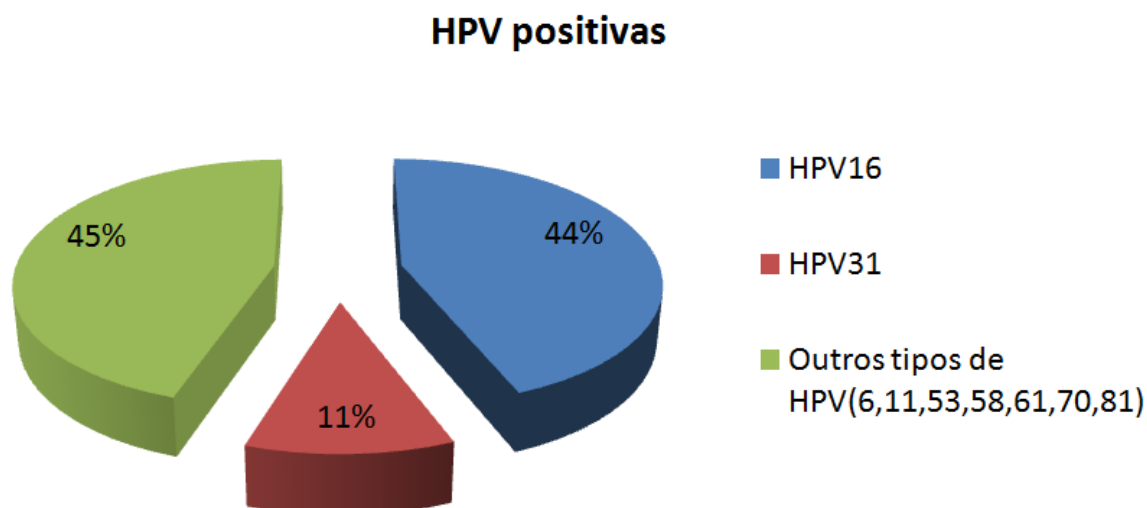


Figura 24 – O gráfico acima mostra a percentagem das pacientes infectadas com HPV. Em azul, pacientes infectadas com o tipo 16, 44%. Em vermelho, pacientes infectadas com o tipo 31, 11%. Em verde, pacientes infectadas com outros tipos de HPV, 45%.

Das amostras infectadas por HPV 16, 30% apresentaram co-infecção com os tipos 11, 31, 58, 61 e 70.

5.1.2 - Análise da amostra por grupos

A tabela 4 mostra as características clínicas e sócio-demográficas entre os grupos classificados de acordo com a presença ou ausência de lesões. No grupo controle foram incluídas as pacientes HPV positivas que não apresentavam lesões cervicais. No grupo de casos foram incluídos lesões de baixo grau (26 pacientes) e lesões de alto grau (29 pacientes).

Dentre as características clínicas e sócio-demográficas das pacientes, observou-se variação etária de 16 a 58 anos. Diferença significativa foi observada entre os grupos estudados em relação à idade das pacientes ($p = 0.01$). Em mulheres com lesões cervicais, a faixa etária mais frequente foi entre 10 e 29 anos (22 pacientes, 42%).

Com relação ao tabagismo, constatou-se maior número de mulheres não fumantes nos dois grupos estudados, não se observando diferença significativa tais grupos ($p = 0.07$).

Quanto à idade da primeira relação sexual, verificou-se que a maioria das pacientes teve seu primeiro intercuro sexual entre 15 e 20 anos nos dois grupos em estudo.

No que se refere ao número de parceiros sexuais, a maioria das pacientes tiveram até dois parceiros ao longo da vida nos dois grupos, os quais não apresentaram diferença significativa entre eles ($p = 0.81$).

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em relação ao uso de preservativos ($p = 0.55$). Constatou-se maior número de mulheres que não usavam preservativos nos dois grupos estudados.

A maior parte das pacientes também não fazia uso de anticoncepcional tanto nos controles quanto nos casos, não observando diferença significativa entre os grupos ($p=0.22$).

Quanto ao número de partos, não se observou diferença significativa entre os grupos ($p = 0.13$). Houve maior número de mulheres com até três partos, em ambos os grupos.

Houve maior número de mulheres casadas tanto nos controles quanto nos casos, não observando diferença significativa entre os grupos ($p = 0.31$).

Quanto ao tipo de HPV, observou-se diferença significativa entre os grupos ($p < 0.0001$). Constatou-se que entre as pacientes com lesões cervicais, o HPV16 apresentou maior frequência (60% 35 pacientes).

Tabela 4: Características clínicas-biológicas e sócio-demográficas das pacientes de acordo com a presença ou ausência de lesão.

Características	Controle		Casos			P
	n	%	n	%	Total	
Idade						
10 - 29 anos	5	15	22	42	27	0.01*
30 – 39 anos	9	27	14	27	23	
40 - 49 anos	10	30	13	24	23	
50 – 60 anos	9	28	4	7	13	
Total	33	100	53	100	86	
Tabagismo						
Fumantes	6	18,18	9	15	15	0.07*
Não fumantes	27	82	46	75	73	
Ex fumantes	0	0	6	10	6	
Total	33	100	61	100	94	
Idade da 1ª relação sexual						
≤ 14	3	9,37	18	25	21	0.14*
15 – 20	23	71,87	44	62	67	
≥ 21	6	18,75	9	13	15	
Total	32	100	71	100	103	
Número de parceiros						
≤ 2	23	70	37	65	60	0.81
≥ 3	10	30	20	35	30	
Total	33	100	57	100	90	
Uso de preservativo						
Usa	9	27	17	36	26	0.55
Não usa	24	73	30	64	54	
Total	33	100	47	100	80	
Uso de anticoncepcional						
Usa	5	15	17	29	22	0.22
Não usa	28	85	42	71	70	
Total	33	100	59	100	92	
Número de partos						
< 3	28	85	31	67	59	0.13
≥ 3	5	15	15	33	20	
Total	33	100	46	100	79	
Estado civil						
Solteira	13	40	12	21,81	25	0.31*
Casada	18	54	40	72,72	58	
Divorciada	0	0	1	1,81	1	
Viúva	2	6	2	36,36	4	
Total	33	100	55	100	88	
Tipos de HPV						
HPV 16	5	15	35	60	40	<0.0001*
HPV 31	2	6	8	14	10	
Outros tipos	26	79	15	26	41	
Total	33	100	58	100	91	

* Teste – G de aderência. $p < 0.05$ - estatisticamente significativa

5.2 – Análise genética

Toda a população estudada encontrou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada por meio do teste de qui-quadrado no grupo de casos, lesões de baixo grau (LSIL), lesões de alto grau (HSIL) e controles para todos os polimorfismos estudados. Em todos os grupos as frequências dos alelos e genótipos não mostraram diferenças significativas entre as frequências esperadas e observadas (Tabela 5).

Tabela 5: Valores de p e χ^2 para as análises do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos controles, casos, lesões de baixo e alto graus.

Polimorfismo	Controles	Casos	LSIL	HSIL
T309G	$p = 0.77$	$p = 0.53$	$p = 0.42$	$p = 0.95$
(rs2279744)	$\chi^2 = 0.08$	$\chi^2 = 0.38$	$\chi^2 = 0.63$	$\chi^2 = 0.00$
SNPC590T	$p = 0.59$	$p = 0.24$	$p = 0.37$	$p = 0.44$
(rs1059234)	$\chi^2 = 0.28$	$\chi^2 = 1.33$	$\chi^2 = 0.77$	$\chi^2 = 0.57$

p = do teste de qui-quadrado. χ^2 = qui-quadrado

5.2.1. Polimorfismo T309G do gene *MDM2*

A análise do polimorfismo T309G do gene *MDM2* não mostrou associação entre seus alelos e genótipos nos grupos de casos comparados aos controles, que consistiam de amostras de pacientes HPV negativas livres de lesões cervicais ($p = 0.73$ e $p = 0.66$) (tabela 6).

Estratificando para os tipos de lesões (LSIL e HSIL) comparados aos controles não se observou diferença estatisticamente significativa entre as frequências alélicas e genotípicas. ($p = 1$ e $p = 0.79$; $p = 0.69$ e $p = 1$). Esses resultados sugerem que o alelo G não está associado ao desenvolvimento de lesões cervicais na população estudada.

5.2.2 - polimorfismo SNPC590T de *WAF1*

Comparando as frequências alélicas e genotípicas do grupo de casos ao grupo de controles, não se observaram diferenças estatisticamente significantes entre elas ($p = 0.47$ e $p = 0.39$) (Tabela 6).

Estratificando o grupo de casos em relação ao grau das lesões também não se observou diferenças estatisticamente significantes entre as frequências alélicas e genotípicas do grupo de lesões cervicais de baixo grau (LSIL) comparadas ao grupo controle ($p = 0.39$ e $p = 0.43$) (Tabela 6) bem como do grupo de lesões cervicais de alto grau (HSIL) comparadas ao grupo controle ($p = 0.53$ e $p = 0.61$) (Tabela 6). Esses resultados sugerem que o alelo T não está associado com o desenvolvimento de lesões cervicais de baixo e alto graus em mulheres HPV positivas quando comparadas a mulheres HPV positivas sem lesões nas amostras estudadas.

Tabela 6: Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo T309G do gene *MDM2* e C590T do gene *WAF1* entre os grupos casos, LSIL, HSIL comparados aos controles.

POLIMORFISMOS	CONTROLES	CASOS	LSIL	HSIL
MDM2 T309G				
Alelos	(n=36)	(n=55)	(n=26)	(n=29)
T	50 (70%)	80 (73%) OR=1	37 (71%) OR=1	43 (74%)OR=1
G	22 (30%)	30 (27%) OR=0.85 CI=0.42 – 1.73 p=0.73	15 (29%) OR=0.92 CI=0.38 – 2.15 p= 1	15 (26%) OR=0.79 CI=0.33 – 1.83 p=0.69
Genótipos				
TT	17 (48%)	30 (55%)OR =1	14 (54%) OR=1	16 (55%) OR=1
TG+GG	19 (52%)	25 (45%) OR=0.77 CI=0.30 – 1.94 p=0.66	12 (46%) OR=0.77 CI= 0.24 – 2.36 p=0.79	13 (45%) OR=0.96 CI=0.51 – 1.81 p=1
WAF1C 590T				
Alelos	(n=37)	(n=54)	(n=26)	(n=28)
C	59 (80%)	80 (74%) OR=1	38 (73%) OR=1	42 (75%) OR=1
T	15 (20%)	28 (26%)OR=1.37 CI=0.64 – 3.03 p=0.47	14 (27%) OR=1.41 CI=0.57 – 3.62 p=0.39	14 (25%) OR=1.30 CI=0.52 – 3.25 p=0.53
Genótipos				
CC	23 (62)	28 (52%) OR=1	13 (50%) OR=1	15 (54%) OR=1
CT+TT	14 (38)	26 (48%) OR=1.51 CI=0.60 – 3.92 p=0.39	13 (50%) OR=1.62 CI=0.52 – 5.11 p=0.43	13 (46%) OR=1.41 CI=0.46 – 4.32 p=0.61

$p < 0.05$ - estatisticamente significante. OR – odds Ratio. 95% CI – intervalo de confiança 95%

6. DISCUSSÃO

O câncer cervical é considerado a causa mais letal dos cânceres ginecológicos. O principal fator de risco para o desenvolvimento desta doença como também suas lesões precursoras, é a infecção pelo Papilomavírus Humano - HPV (RICHAR; BARRON, 1969), a qual por si só, não é suficiente para o desenvolvimento do câncer, fazendo-se necessária a participação de co-fatores ambientais e genéticos que contribuem para a persistência da infecção viral (CASTLE *et al.*, 2002).

Na literatura é descrito que a faixa etária mais susceptível às infecções por HPV é na terceira década, apresentando um pico de 23,6% e um decréscimo após os 30 anos de idade (CLAVEL *et al.*, 2001), e que a prevalência da infecção por HPV é maior em mulheres entre 14 e 24 anos, sofrendo um declínio com o aumento da idade (DUNNE *et al.*, 2007). Os nossos resultados fortalecem esta teoria por ter sido observado que mulheres na faixa etária entre 10 e 29 anos de idade se mostraram mais susceptíveis ao desenvolvimento de lesões cervicais, enquanto que mulheres entre 50 a 59 anos mostraram-se menos susceptíveis.

A associação entre tabagismo e lesões cervicais não foi estatisticamente significativa neste trabalho, não representando um fator de risco para o desenvolvimento de lesões cervicais, o que contraria estudos realizados anteriormente. O risco de desenvolver lesões cervicais em mulheres fumantes e que mastigam o fumo vai de moderado a alto (KAPEU *et al.*, 2009), sendo até 27 vezes maior (GUNELL, 2007) do que em mulheres que não fumam. Além disso, a infecção por HPV dura em média 8,5 meses em pacientes que nunca fumaram e 10,7 meses em pacientes fumantes (GIULIANO *et al.*, 2002). A baixa frequência de lesões cervicais em pacientes fumantes encontrada neste estudo pode ser devido ao tamanho da amostra analisada.

No presente estudo, o início da atividade sexual entre 15 e 20 anos foi mais frequente entre pacientes com lesões cervicais, porém a diferença não foi significativa. Os estudos apontam para o início precoce de relações sexuais como um fator de risco para o desenvolvimento de lesões e câncer cervicais (FREGA *et al.*,

2003; PLUMMER *et al.*, 2011; SANJOSE *et al.*, 2008), devido ao maior o tempo de exposição ao vírus (PLUMMER *et al.*, 2011).

Dados da literatura relacionam o comportamento sexual ao risco de infecção por HPV e, conseqüentemente ao desenvolvimento de lesões cervicais (BOSCH; IFTNER 2005; HO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2006). Os riscos da infecção é quatro vezes maior para pacientes que tiveram número elevado de parceiros num período de cinco anos (ALMONTE *et al.*, 2011). Porém, o número de parceiros sexuais das pacientes desse estudo não constituiu um fator de risco para lesões cervicais. Acredita-se que as informações cedidas pelas pacientes deste estudo, referente ao número de parceiros sexuais, esteja subestimada pelo fato das mesmas se sentirem constrangidas em revelar que tiveram acima de dois parceiros.

O desenvolvimento de lesões cervicais foi maior em pacientes que não faziam uso de preservativos, apesar de a diferença não ter sido significativa no presente estudo. O uso de preservativo na redução da infecção por HPV é discutível. Alguns autores sugerem que o uso de preservativo não reduz os riscos para infecções por HPV (HO *et al.*, 1998; KJAER *et al.*, 2000; WINER *et al.*, 2003). O uso inadequado do preservativo pode estar associado à falha na proteção contra infecções por HPV, pois o vírus pode ser transmitido através do contato sexual não penetrante (WINER *et al.*, 2003). Contudo, Winer *et al.* (2006) observou que a incidência de infecção em pacientes cujos parceiros usavam preservativo durante toda a relação sexual foi de 37,8 por 100 pacientes, enquanto que em pacientes cujos parceiros usavam preservativo menos que 5% do tempo a incidência de infecção foi de 89,3 por 100 pacientes.

A associação do uso do anticoncepcional com o desenvolvimento de lesões cervicais é discutível. No presente estudo, o uso de anticoncepcional não se apresentou como fator de risco para lesão cervical, embora tenha sido mais frequente entre pacientes com lesões cervicais, confirmando os resultados obtidos por Castle *et al.* (2002) e Hildesheim *et al.* (2001). Contudo, o uso de anticoncepcional oral tem sido associado à infecção por HPV bem como ao desenvolvimento de lesões cervicais (LI *et al.*, 2010; SMITH *et al.*, 2003). Segundo GADDUCCI *et al.*, 2011, o risco relativo de lesão e câncer cervical aumenta com a duração do uso do anticoncepcional. O uso de anticoncepcional por menos de 5

anos representa um risco de 1.1, entre 5 a 9 anos de uso, o risco sobe para 1.6 e para uso por 10 anos ou mais, o risco passa para 2.2 (SMITH *et al.*, 2003).

Neste trabalho, multiparidade não representou fator de risco para lesões cervicais, apesar da maior frequência de múltiparas ter ocorrido entre os casos. Resultados semelhantes foram descritos por Castle *et al.* (2002) e Li *et al.* (2010). Contudo, resultados obtidos por Castellsagué; Munoz (2003) sugeriram que alta paridade atua como co-fator que modulam o risco de progressão para lesões e câncer cervicais. Hildesheim *et al.* (2001) encontraram que 44% das lesões cervicais podem ser atribuídas a multiparidade.

Neste estudo, o HPV-16 foi o tipo mais prevalente entre pacientes com lesões cervicais com frequência de 35%, seguida pelo HPV-31 com frequência de 8%. Os tipos 18 e 33 não foram encontrados nas pacientes deste estudo. Mundialmente, o tipo 16 é o mais prevalente, o qual foi detectado em aproximadamente 40% das lesões cervicais, salvo na Indonésia, onde prevalece o tipo 18 (BOSCH *et al.*, 1995; LI *et al.*, 2010). Na América do Sul a maior prevalência é do tipo 16, seguida do tipo 18, 45, 31 e 33 (BOSH *et al.*, 1995). No Brasil, a maior prevalência também é do tipo 16, seguido dos tipos 18, 31 e 33. Em Pernambuco, segundo Baldez da Silva, *et al.* (2009), o tipo 16 é o mais prevalente seguido dos tipos 31, 33 e 18, resultado discordante daquele obtido por Lima *et al.* (2011), onde o tipo 18 é o mais prevalente depois do HPV-16, seguido dos tipos 31 e 33.

Além dos co-fatores ambientais, características individuais, como variações genéticas, também são consideradas co-fatores importantes na susceptibilidade ao câncer cervical. Assim, como fatores preditivos, é de grande importância estudar e entender o papel de polimorfismos na susceptibilidade à lesões e ao câncer cervical.

No presente trabalho foi avaliada a associação entre polimorfismos T309G do gene *MDM2* e o risco de desenvolver lesões cervicais e a susceptibilidade ao câncer cervical em pacientes HPV positivas.

O gene *MDM2* codifica para a oncoproteína de 90-kDa, mdm2, a qual se liga especificamente à proteína p53 e inativa sua atividade supressora de tumor (CHEN, *et al.*, 1993; FREEDMAN *et al.*, 1999). Ao mesmo tempo em que regula os níveis de p53 na célula, *MDM2* tem sua expressão ativada pela p53.

Bond *et al.* (2004) utilizando pacientes com câncer hereditário – síndrome de Li-Fraumeni – e sarcomas esporádicos de tecido mole, observou que SNP na região promotora de *MDM2* estava associado com a formação de tumores tanto hereditários quanto esporádicos.

Estudos epidemiológicos têm avaliado a associação entre o polimorfismo T309G de *MDM2* e o risco de diferentes tipos de câncer. Porém, existem poucos estudos que se propõem avaliar a relação deste polimorfismo com lesões e câncer cervicais. O presente trabalho é o segundo realizado no Brasil até o momento. A frequência do alelo G neste estudo foi de apenas 27% em pacientes com lesões cervicais em oposição à frequência encontra nos controles, que foi de 30%, não observando diferenças significantes entre eles. Resultado semelhante foi obtido por Meissner *et al.* (2007) que avaliaram a presença do polimorfismo em pacientes do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. A frequência do alelo G foi maior nos controles do que em lesões cervicais malignas, não havendo diferenças significantes entre eles. Embora uma alta frequência do alelo G (47.9%) tenha sido detectada em descendentes africanos mistos quando comparados com descendentes europeus (34.6%), tal diferença não foi significativa.

Porém, Nunobiki *et al.* (2010) demonstraram haver um aumento no risco para genótipos TG+GG em lesões cervicais comparados aos controles de pacientes infectados com HPV. A frequência do alelo G foi de 52,8% nos controles, 49,4% em lesões cervicais de baixo grau (LSIL) e 54,9% em lesões cervicais de alto grau (HSIL). A diferença entre eles foi significativa, sugerindo uma associação de T309G *MDM2* com a carcinogênese cervical na população japonesa.

Wasielewski *et al.* (2007) observaram que SNP309 *MDM2* estava envolvido com a aceleração da carcinogênese de mama em mulheres holandesas. Além disso, o genótipo GG também está associado com o risco de carcinoma hepatocelular em pacientes japoneses com hepatite C crônica (DHAREL *et al.*, 2006), bem como com um aumento no risco para câncer renal e um prognóstico sombrio e baixa sobrevida em pacientes acometidos com esta doença (HIRATA *et al.*, 2007). Polimorfismos T309G *MDM2* estão associados ao aumento no risco (OR=4.26) de desenvolvimento de osteosarcoma de alto grau em mulheres italianas. Tal resultado confirma a idéia de que o estrogênio pode desempenhar um papel na capacidade do alelo G na formação de osteosarcoma em mulheres (TOFFOLI *et al.*, 2011).

Proteína mdm2 foi detectada através de ensaio de imunohistoquímica em 13% dos portadores do genótipo TT, 26% em portadores do genótipo TG e 50% em portadores do genótipo GG com câncer renal (HIRATA *et al.*, 2007). Além disso, a super expressão de *MDM2* também foi detectada em carcinomas cervicais (SKOMENDAL *et al.*, 1999). Tais resultados mostram que a proteína mdm2 pode ter um papel importante nesses tipos de cânceres.

A proteína mdm2 codificada pela variante homozigota (GG) pode marcar a p53 mais eficientemente para degradação do que a proteína mdm2 codificada pelo genótipo TT (BOERSMA *et al.*, 2006). SNP309 *MDM2* mostrou uma associação significativa com a sobrevida global de pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas por parecer modificar a via supressora de tumor da p53. Pacientes com genótipos TG e GG mostraram ter uma sobrevida global significativamente mais curta do que aqueles com genótipos TT e apresentaram também menor superexpressão de TP53 do que portadores do genótipo TT (HAN *et al.*, 2008).

Em contraste, outros estudos têm mostrado que o alelo G está associado com o risco reduzido de alguns tipos de câncer como de pulmão (LI *et al.*, 2006), carcinoma oral de células escamosas em pacientes infectados por HPV (CHEN *et al.*, 2010) e câncer do colo retal (TALSETH *et al.*, 2007).

Diferenças existentes entre os resultados deste trabalho e a literatura podem ser associadas ao número limitado de amostras analisadas e/ou ao fato de que polimorfismos genéticos geralmente variam entre grupos de populações de diferentes regiões geográficas (MEISSNER *et al.*, 2007). Em nosso estudo, não houve evidencia para o envolvimento do polimorfismo T309G *MDM2* com o desenvolvimento de lesões cervicais e a susceptibilidade ao câncer cervical.

Além do polimorfismo T309G *MDM2*, este trabalho também avaliou a relação do polimorfismo C590T *WAF1* com a susceptibilidade a lesões e ao câncer cervicais.

O gene *WAF1* codifica para a proteína p21 a qual desempenha um papel importante na supressão da proliferação celular (GOROSPE; WANG; HOLBROOK, 1999). Esse gene é transativado pela proteína supressora de tumor, p53. Polimorfismos na região 3'UTR de *WAF1* podem causar uma instabilidade no RNAm e favorecer sua rápida degradação, pois sabe-se que a sequência de DNA existente nessa região determina a estabilidade do RNAm (CHEN; AMARA; WRIGHT, 1993;

HAO; BALTIMORE, 2009; LAGUETTE *et al.*, 2011). Assim, a ausência da proteína p21 pode afetar negativamente a parada do ciclo celular na fase G1 em resposta a um dano no DNA. Devido ao fato dos polimorfismos no códon 31 e na região 3'UTR se segregarem juntos (FANCHER *et al.*, 1997; SHIOHARA *et al.*, 1994), a maioria dos trabalhos se detém apenas ao estudo do polimorfismo no códon 31, o qual, segundo Konishi *et al.* (2000), parece ser apenas um espectador e que o sítio 3'UTR ligado firmemente ao sítio do códon 31 pode estar envolvido na associação a tumorigêneses.

Polimorfismos no gene *WAF1* tem sido relacionado ao aumento do risco de câncer em alguns, mas não em todos os estudos realizados. Tais polimorfismos foram associados à susceptibilidade ao câncer endometrial na população japonesa e coreana (HACHIYA *et al.*, 1999; ROH *et al.*, 2004), ao câncer de próstata na população caucasiana (KIBEL *et al.*, 2003), câncer de mama em africanas-americanas e latinas (KESHAVA *et al.*, 2002) e chinesas no período pré-menopausa (MA *et al.*, 2006), ao risco de desenvolver câncer esofágico (WU *et al.*, 2003); adenocarcinoma de próstata e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (FACHER *et al.*, 1997).

Xi *et al.* (2004) não encontraram associação com o aumento do risco de câncer gástrico intestinal bem como às lesões precursoras em pacientes chineses. Num estudo com 113 tumores de pele não houve associação com polimorfismos no gene *WAF1* entre pacientes japoneses (KONISHI *et al.*, 2000). A ausência de associação deste polimorfismo também foi observada em tumores de ovários (MILNER *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 2006), tumores de pele (KONISHI *et al.*, 2000), com o risco de câncer colorretal (LIU *et al.*, 2009).

A ausência de alterações em *WAF1* em um grande número de tumores malignos humanos sugere que mutações em *WAF1* podem não desempenhar um papel importante no início ou na progressão da malignidade (SHIOHARA *et al.*, 1994).

No presente trabalho, nenhuma associação entre polimorfismo C590T no gene *WAF1* e lesões cervicais foi observado, concordando com os resultados obtidos por Kim *et al.* (2001) que estudaram a relação destes polimorfismos com o risco de desenvolver câncer da cérvix em mulheres coreanas, somando aos achados de Santos *et al.* (2006), que não encontraram associação ao estudarem

pacientes européias. No entanto, os resultados deste trabalho diferiram daqueles obtidos por Tian *et al.* (2010), os quais sugeriram que polimorfismo em *WAF1* atua como um fator genético de risco para desenvolvimento de carcinoma de células escamosas da cérvix quando comparados aos controles que não apresentavam lesões.

Neste trabalho, a variante T não resultou em nenhum efeito sobre a susceptibilidade a lesões cervicais. Segundo Shiohara *et al.* (1994), a ausência de alteração em *WAF1* pode ser atribuída ao fato de que mutações e inativações nesse gene sejam catastróficas, resultando na morte da célula. Dessa maneira, se tal alteração ocorrer em neoplasias humanas, deve ser um evento raro.

Portanto, polimorfismos em *MDM2* e *WAF1* têm sido associados com alguns tipos de cânceres e suas lesões precursoras. Assim, com base nessas evidências, este trabalho se propôs a investigar se polimorfismos nestes genes em conjunto com a presença do Papilomavírus humano podem ter um papel importante no aumento da susceptibilidade a lesões e, conseqüentemente, ao câncer cervical. Neste estudo, para cada polimorfismo analisado, não foi observado associação com as lesões cervicais em pacientes com HPV da amostra estudada. Sendo esses resultados sugestivos de que polimorfismos T309G do gene *MDM2* e C590T do gene *WAF1* não são fatores de risco para a susceptibilidade a lesões cervicais pré-malignas e malignas em pacientes HPV positivas na amostra estudada.

7 - CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos deste estudo conclui-se que polimorfismos T309G *MDM2* e C590T *WAF1* não estão relacionados com o aumento da susceptibilidade às lesões e câncer cervicais em pacientes infectadas pelo HPV nas amostras analisadas.

8. REFERENCIAS

ABBAS, Tarek; DUTTA, Anindya. **p21 in cancer: intricate networks and multiple activities**. Nature. V. 9, p. 400-411, 2009.

ALMONTE, Maribel. *et al.* **Sexual behavior and HPV infection in British women, by postal questionnaires and telephone interviews**. Journal of Medical Virology. V. 83, n.7, p. 1238–1246, 2011.

ANTILLA, T. *et al.* **Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and Risk for Development of Cervical Squamous Cell Carcinoma**. JAMA. V. 285, n. 1, p. 47-51. 2001.

BAKER, Carl C. *et al.* **Structural and translational analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines**. Journal of Virology V. 61, n.4, p. 962-971, 1987.

BALDEZ da Silva, Maria Fernanda. *et al.* **HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil**. Genet Mol Res. V. 8, p. 1437-1443, 2009.

BATES, Stewart; VOUSDEN, Karen H. **p53 in signalling checkpoint arrest or apoptosis**. Curr. Opin. Genet. V. 6, n.1, p. 1–7, 1996.

BEKKERS, Ruud L. M. *et al.* **Epidemiological and Clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer**. Rev. Med. Virol. V. 14, p. 95-105, 2004.

BERNARD, Hans-Ulrich. *et al.* **Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments**. Virology. V. 401, n. 1, p. 70 – 79.

BODILY, Jason; LAIMINS, Laimonis A. **Persistence of human papillomavirus infection: key to malignant progression**. Trends in Microbiology. V. 19, n.1, p. 33-39, 2011.

BOERSMA, Brenda J. *et al.* **Association of breast cancer outcome with status of p53 and MDM2 SNP309**. Journal of the National Cancer Institute. V.98, n.13, p. 911-919, 2006.

BOND, Gareth L. *et al.* **A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans.** *Cell*. V.119, p.591-602, 2004.

BOND, Gareth L.; LEVINE, Arnold J. **A single nucleotide polymorphism in the p53 pathway interacts with gender, environmental stresses and tumor genetics to influence cancer in humans.** *Oncogene*. V.26, p. 1317-1323, 2007.

BOSCH, F. Xavier; IFTNER, Thomas. **The aetiology of cervical cancer.** Sheffield, UK: NHS Cervical Screening Programme. 2005.

BOSCH, F. Xavier; QIAO, You-Lin; CASTELLSAGUÉ, Xavier. **The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer.** *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. Supplement 1: S8-S21. 2006.

BOSCH, Xavier F; DE SANJOSE, Silva. **The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer.** *Disease Markers*. V. 23, p. 213-217, 2007.

BOYER, Sarah N.; WAZER, David E.; BAND, Vimala. **E7 protein of human papillomavirus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway.** *Cancer Research*. V. 56, p. 4620-4624, 1996.

BUCK, Christopher B. *et al.* **Maturation of Papillomavirus Capsids.** *J Virol*. V. 79, n. 5, p. 2839-2846, 2005.

BURD, Eileen M. **Human Papillomavirus and Cervical Cancer.** *Clinical Microbiology Reviews*. V. 16, n.1, p. 1-17, 2003.

CASTELLSAGUÉ, Xavier. *et al.* **Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners.** *The New England Journal of Medicine*. V. 346, n.15, p. 1105-1112, 2002.

CASTELLSAGUÉ, Xavier. **Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer.** *Gynecologic Oncology*. V. 110, n. 3, Supplement 2, p. S4-S7, 2008.

CASTELLSAGUÉ, Xavier; MUÑOZ, Nubia. **Cofactors in Human Papillomavirus Carcinogenesis—Role of Parity, Oral Contraceptives, and Tobacco Smoking.** *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. n. 31, p. 20-28, 2003.

CASTLE, Philip E. *et al.* **A Prospective Study of High-Grade Cervical Neoplasia Risk Among Human Papillomavirus-Infected Women.** Journal of the National Cancer Institute. V. 94, n. 18, p. 1406-1414, 2002.

CHEN, Frank Y.; AMARA, Francis M; WRIGHT, Jim A. **Mammalian ribonucleotide reductase R1 mRNA stability under normal and phorbol ester stimulating conditions: involvement of a cis-trans interaction at the 3'untranslated region.** The EMBO Journal. V. 12, n.10, p. 3977-3986, 1993.

CHEN, Xingming. *et al.* **Human Papillomavirus Seropositivity Synergizes with MDM2 Variants to Increase the Risk of Oral Squamous Cell Carcinoma.** Cancer Research. V. 70, p. 7199-7108, 2010.

CHIPUK, Jerry E. *et al.* **PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53.** Science. V. 309, n. 5741, p. 1732–1735, 2005.

CLAVEL, C. *et al.* **Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women.** British Journal of Cancer. V. 89, n.12, p.1616–1623, 2001.

CORNEANU, Lavinia Mihaela; STÄNCULESCU, Diana; CORNEANU, Cecilia. **HPV and cervical squamous intraepithelial lesions: clinicopathological study.** Rom J Morphol Embryol. V. 52, n. 1, p. 89–94, 2011.

CORTESE, Marc S.; ASHRAFI, G Hossen; CAMPO, M. Saveria. **All 4 di-leucine motifs in the first hydrophobic domain of the E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 are essentialfor surface MHC class I downregulation activity and E5 endomembrane localization.** International Journal of Cancer. V. 126, n.7, p. 1675-1682, 2009.

CROOK, Tim. *et al.* **Transcriptional activation by p53 correlates with suppression of growth but not transformation.** Cell. V. 79, n.5, p. 817–827, 1994.

DEACON, J M. *et al.* **Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case–control study nested within the Manchester cohort.** British Journal of Cancer. V. 88, n.11, p. 1565–1572, 2000.

DELAVAINE, Laurent; THANGUE LA, Nicholas B. L. **Control of E2F activity by p21^{Waf1/Cip1}.** Oncogene. V.18, n.39, p. 5381-5392, 1999.

DESHAIES, Raymond J; JOAZEIRO, Claudio A P. **RING Domain E3 Ubiquitin Ligases**. Annual Review of Biochemistry.V. 78, p. 399–434, 2009.

DE VILLIERS, Ethel-Michele. *et al.* **Classification of papillomaviruses**. Virology. V. 324, p. 17-27, 2004.

DHAREL, N. *et al.* **MDM2 promoter SN309 is associated with risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C**. Clin Cancer Res. V. 12, p.4867-4871, 2006.

DUNNE, Eileen F. *et al.* **Prevalence of HPV Infection Among Females in the United States**. The Journal American Medical Association. V. 297, n. 8, 813-819, 2007.

DYSON, Nicholas. *et al.* **Homologous sequences in adenovirus E1 A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins**. Journal of Virology. V.66, n.12, p. 6893-6902, 1992.

EINSTEIN, Mark H.; GOLBERG, Gary L. **Human Papilomavirus and Cervical Neoplasia**. Cancer Investigation. V. 20, n. 7-8, p. 1080-1085, 2002.

EL-DEIRY, Wafik S. *et al.* **WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression**. Cell. V. 75, p.817– 825, 1993.

FAKHARZADEH, Steven; TRUSKO, Stephen P.; GEORGE, Donna L. **Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line**. EMBO J. V. 10, n.6, p. 1565-1569, 1991.

FACHER, Evan A. *et al.* **Association between human cancer and two polymorphisms occurring together in the p21Waf1/Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor gene**. Cancer. V. 79, n.12, p. 2424-2429, 1997.

FAVRE, Michel. *et al.* **Chromatin-Like Structures Obtained After Alkaline Disruption of Bovine and Human Papillomaviruses**. Journal of Virology. V. 21, n. 3, p. 1205-1209, 1977.

FRANCO, Eduardo L.; DUARTE-FRANCO, Eliane; FERENCZY, Alex. **Cervical Cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection**. Canadian Medical Association Journal. V. 7, n. 7, p. 1017-1025, 2001.

FREEDMAN, D. A.; WU, L.; LEVINE, A. J. **Functions of MDM2 oncoprotein.** Cellular and molecular life sciences. V. 55, p. 96-107, 1999.

FREGA, Antonio. *et al.* **Young women, cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus: risk factors for persistence and recurrence.** Cancer Letters. V. 196, n.2, p.127-134, 2003.

FROLOV, Maxim V; DYSON, Nicholas J. **Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression.** Journal of Cell Science. V. 117, n. 11, p. 2173-2181, 2004.

GADDUCCI, Angiolo. *et al.* **Smoking habit, immune suppression, oral contraceptive use, and hormone replacement therapy use and cervical carcinogenesis: a review of the literature.** Gynecological Endocrinology. V. 27, n. 8, p. 597-604, 2011.

GAO Peng; ZHEG, Jie. High-risk HPV E5-induced cell fusion: a critical initiating event in the early stage of HPV-associated cervical cancer. **Virology Journal. V.7, p. 238-240, 2010.**

GENG, Ying. *et al.* **Cytoplasmic p53 and Activated Bax Regulate p53-dependent, Transcription-independent Neural Precursor Cell Apoptosis.** Journal of Histochemistry & Cytochemistry. V. 58, n.3, p. 265-275, 2010.

GIULIANO, Anna R. *et al.* **Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: The Young Women's Health Study.** J Infect Dis. V. 186, n.4, p. 462–9, 2002.

GONZÁLEZ, Paula. *et al.* **Behavioral/Lifestyle and Immunologic Factors Associated with HPV Infection among Women Older Than 45 Years.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. V. 19, n.12, p. 3044-3054, 2010.

GOROSPE, M; WANG, X; HOLBROOK, N.; J. **Functional role of p21 during the cellular response to stress.** Gene expression. V. 7, n. 4-6, p. 377-385, 1999.

GUNELL, A. **Risk factors for cervical cancer development.** 2007. 80f. Departament of Medical Epidemiology and Biostatistics, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden. 2007.

HACHIYA, Toshiro. *et al.* **WAF1 Genotype and Endometrial Cancer Susceptibility.** Gynecologic Oncology. V. 72, n.2, p. 187–192, 1999.

HAN, Ji-Youn. *et al.* **Association of p53 Codon 72 Polymorphism and MDM2 SNP309 With Clinical Outcome of Advanced Nonsmall Cell Lung Cancer.** Cancer. V. 113, p. 799-807, 2008.

HAO, Shengli; BALTIMORE, David. **The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules.** Nature Immunology. V. 10, p. 281 – 288, 2009.

HARIMA, Yoko. *et al.* **Polymorphism of the WAF1 gene is related to susceptibility to cervical cancer in Japanese women.** International Journal of Molecular Medicine. V. 7, n.3, p. 261-264, 2001.

HARPER, J Wade. *et al.* **The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.** Cell. V. 75, n.4, p. 806-816, 1993.

HARRIS, Curtis. C.; HOLLSTEIN, Monica. C. **Clinical implications of the p53 tumor-supressor gene.** The new England Journal of Medicine. V. 329, p. 1318-1327, 1993.

HARRIS, Sandra. L.; LEVINE, Arnold J. **The p53 pathway: positive and negative feedback loops.** Oncogene. V 24, p. 2899-2908, 2005.

HAUPT, Y.*et al.* **Mdm2 promotes the rapid degradation of p53.** Nature. V. 387, p. 296 – 299, 1997.

HAUPT, Ygal; BARAK, Yaacov; OREN, Moshe. **Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2.** EMBO J. V. 15, n.7, p. 1596-1606, 1996.

HEMMINKI, Kari; CHEN, Bowang. **Familial Risks for Cervical Tumors in Full and Half Siblings: Etiologic Apportioning.** Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. V.15, n. 7, p. 1413-1414, 2006.

HILDESHEIM, A. *et al.* **HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica.** British Journal of Cancer. V. 84, n.4, p. 1219–1226, 2001.

HIRATA, Hiroshi. *et al.* **MDM2 SNP309 Polymorphism as Risk Factor for Susceptibility and Poor Prognosis in Renal Cell Carcinoma.** Clin. Cancer Res. V.13, n.14, p. 4123-4129, 2007.

HO, Gloria Y. *et al.* **Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women.** N Engl J Med. V. 338, n.7, p. 423–428, 1998.

HO, Glória YF. *et al.* **Risk Factors for Subsequent Cervicovaginal Human Papillomavirus (HPV) Infection and the Protective Role of Antibodies to HPV-16 Virus-Like Particles.** The Journal of Infectious Diseases.V.186, p. 737–742, 2002.

HORVATH, Caroline AJ. *et al.* **Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview.** Virology Journal. V.7, n.11, p. 1-7, 2010.

HUIBREGTSE, Joh M.; SCHEFFNER, Martin; HOWLEY, Peter. M. **Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53.** Molecular and Cellular Biology. V.13, n.2, p. 775-784, 1993.

HUMMEL, Mary; HUDSON, Jonh B; LAIMINS, Laimonis A. **Differentiation-induced ad constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes.** Journal of virology. V.66, n.10, p. 227-233, 1992.

INCA - Instituto Nacional do Câncer BRASIL. 2011. **Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil.** Ministério da Saúde. Rio de Janeiro.

INCE, Umit; AYDIN, Ozlem; PEKER, Onder. **Clinical importance of “low-grade squamous intraepithelial lesion, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL-H)” terminology for cervical smears 5-year analysis of the positive predictive value of LSIL-H compared with ASC-H, LSIL, and HSIL in the detection of high-grade cervical lesions with a review of the literature.** Gynecologic Oncology. V.121, p. 152-156, 2011.

ITO, Akihiro. *et al.* **P300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2.** The EMBO journal. V. 20, n.6, p.1331-1340, 2001.

JEMAL, A. *et al.* **Global Cancer Statistic.** CA Cancer J Clin. V. 61, p. 69-90, 2011.

JEON, Saewha; ALLEN-HOFFMAN, B. Lynn.; LAMBERT, Paul F. **Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a**

selective growth advantage of cells. Journal of Virology. V.69, n.5, p. 2989-2997, 1995.

JIN, Shengkan; LEVINE, Arnold J. **The p53 functional circuit.** Journal of Cell Science. V.114, n.23, p. 4139-4140, 2001.

KAPEU, Aline Simen. *et al.* **Tobacco smoking and chewing as risk factors for multiple human papillomavirus infections and cervical squamous intraepithelial lesions in two countries (Côte d'Ivoire and Finland) with different tobacco exposure.** Cancer causes and control. V. 20, n.2, p. 163-170, 2009.

Karlsen, Frank. *et al.* **Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus.** J Clinical Microbiol. V. 34, n. 9, p. 2095-2100, 1996.

KESHAVA, Channa. *et al.* **WAF1 (p21) and p53 Polymorphisms in Breast Cancer.** Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. V. 11, p. 127-130, 2002.

KIBEL, Adam S. *et al.* **CDKN1A and CDKN1B Polymorphisms and Risk of Advanced Prostate Carcinoma.** Cancer Research. V. 63, p. 2033-2036. 2003.

KIM, Jae Weon. *et al.* **Polymorphism of TP53 condon 72 and the risk of cervical cancer among Korean Women.** Am J obstet Gynecol. V. 184, n.2, p. 55-58, 2001.

KJAER, Susanne Krüger. *et al.* **Human papillomavirus infection in Danish female sex workers: decreasing prevalence with age despite continuously high sexual activity.** Sex Transm Dis. V. 27, n.8, p. 38-45, 2000.

KONISHI, Reiko. *et al.* **Polymorphisms of p21 cyclin-dependent kinase inhibitor and malignant skin tumors.** Journal of Dermatological Science. V. 24, p. 177-183, 2000.

KOSKELA, Pentti. *et al.* **Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer.** Int. J. Cancer. V. 85, n. 1, p. 35-39, 2000.

LAGUETTE, Mary-Jessica. *et al.* **Sequence variants within the 3'-UTR of the COL5A1 gene alters mRNA stability: Implications for musculoskeletal soft tissue injuries.** Matrix Biology. V. 30, n.5-6, p. 338-345, 2011.

LAMB, Peter; CRAWFORD, Lionel. **Characterization of the Human p 53 Gene.** Molecular and cellular biology. V. 6, n.5, p. 1379-1385, 1986.

LI, Changdong. *et al.* **A Population-based Study on the Risks of Cervical Lesion and Human Papillomavirus Infection among Women in Beijing, People's Republic of China.** Cancer Epidemiol Biomarkers.V. 19, p. 2655-2664, 2010.

LI, Guojun. *et al.* **MDM2 gene promoter polymorphisms and risk of lung cancer: a case–control analysis.** Carcinogenesis. V. 27, n.10, p.2028–2033, 2006.

LIMA Júnior, Sergio Ferreira. *et al.* **Prevalência dos genótipos do papilomavírus humano: comparação entre três métodos de detecção em pacientes de Pernambuco, Brasil.** Rev. Bras. Ginecol. V. 33, n. 10, p. 315-320, 2011.

LIU, Bing. *et al.* **Association of selected polymorphisms of CCND1, p21, and caspase8 with colorectal cancer risk.** Molecular Carcinogenesis. V.49, p. 75-84, 2009.

LOUIE, K. S. *et al.* **Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries.** British Journal of Cancer. V. 100, p. 1191 – 1197, 2009.

LOWY, Douglas R; SCHILLER, Jonh T. **Prophylactic human papillomavirus vaccines.** The Journal of Clinical Investigation. V. 16, n. 5, p. 1167-1173, 2006.

LOZANO, Guilhermina; LUNA, Roberto Montes da Oca. **MDM2 function.** Biochimica et Biophysica Acta. V. 1377, n. 2, p. M55-M59, 1998.

LUO, Yan; HURWITZ, Jerard; MASSAGUÉ, Joan. **Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21^{Cip1}.** Nature. V.375, p. 159-161, 1995.

MA, Hongxia. *et al.* **Variant genotypes of CDKN1A and CDKN1B are associated with an increased risk of breast cancer in Chinese women.** Int. J. Cancer. V. 119, p. 2173-2178, 2006.

MAGNUSSON, Patrick K E; LICHTENSTEIN, Paul; GYLLENSTEN, Ulf B. **Heritability of Cervical Tumours.** Int. J. Cancer. V. 88, n. 5, p. 698-701, 2000.

MAKNI, Hela. *et al.* **P53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation.** Int J Cancer.V. 87, n. 4, p. 528–33, 2000.

MANTOVANI, Fiamma; BANKS Lawrence. **The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression.** *Oncogene*. V.20, n.54, p. 7874-7887, 2001.

MARINE, J-C. *et al.* **Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4.** *Cell death and differentiation*. V. 13, p. 927-934, 2006.

MERCER, W. Edward. *et al.* **Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 87, p. 6166-6170, 1990.

MEISSNER, Rosely de Vasconcellos. *et al.* **No association between SNP309 promoter polymorphism in the MDM2 and cervical cancer in a study from northeastern Brazil.** V.31, p. 371-374, 2007.

MILNER, Ben J. *et al.* **Polymorphisms in P21CIP1/WAF1 are not correlated with TP53 status in sporadic ovarian tumours.** *Eur J Cancer*. V. 32^a, n. 13, p.2360-2363, 1996.

MOMAND, Jamil. *et al.* **The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation.** *Cell*. V. 69, n.7, p. 1237-1245, 1992.

MOODY, Cary A.; LAIMINS, L. A. **Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation.** *Nature*. V.10, p. 550-560, 2010.

MORENO, Victor. *et al.* **Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric casecontrol study.** *The Lancet*. V. 359, n. 9312, p. 1085-1092, 2002.

MORRISON, Richard S. *et al.* **p53-dependent cell death signaling in neurons.** *Neurochem Res*. V. 28, n.1, p.15–27, 2003.

MÜNGER, Karl *et al.* **The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes.** *Journal of Virology*. V. 63, n.10, p. 4417-4421, 1989.

MUÑOZ, Nubia. *et al.* **Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study.** *The Lancet*. V. 359, n. 9312, p. 1093-1101, 2002.

MUÑOZ, Nubia. *et al.* **Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer.** Vaccine. V. 24, p.S1-S10, 2006.

NAKANO, Katsunori. *et al.* **A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73.** Oncogene. V. 19, n.37, p. 4283-4289, 2000.

NIELSON, Carrie M. *et al.* **Associations between Male Anogenital Human Papillomavirus Infection and Circumcision by Anatomic Site Sampled and Lifetime Number of Female Sex Partners.** The Journal of Infectious Diseases. V. 199, n. 1, p. 7–13, 2009.

NIELSON, Carrie M. *et al.* **Consistent Condom Use Is Associated with Lower Prevalence of Human Papillomavirus Infection in Men.** The Journal of Infectious Disease. V. 202, n. 3, p. 445–451, 2010.

NUNOBIKI, Osamu. *et al.* **MDM2 SNP 309 human papillomavirus infection in cervical carcinogenesis.** Gynecologic Oncology. V. 118, p. 258-261, 2010.

O'CONNOR, Mark; BERNARD, Hans-Ulrich. **Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NFI at a conserved composite regulatory element.** Virology. V. 207, n.1, p. 77-88, 1995.

OH, Jung-Min. *et al.* **Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells.** Carcinogenesis. V. 31, n.3, p. 402-410, 2010.

PABA, Pierpaolo. *et al.* **Co-Expression of HSV2 and Chlamydia trachomatis in HPV-Positive Cervical Cancer and Cervical Intraepithelial Neoplasia Lesions Is Associated with Aberrations in Key Intracellular Pathways.** Intervirology. V.51, p. 230–234, 2007.

PARKIN, D.M. *et al.* **Global Cancer Statistic, 2002.** CA A cancer Journal Clinicians. p. 74-108, 2002.

PINE, Sharon R. *et al.* **MDM2 SNP309 and SNP354 Are Not Associated with Lung Cancer Risk.** Cancer Epidemiology Biomarkers. V. 15, n.8, p.1559-1561, 2006.

PLUMMER, Martyn.; PETO, Julian; FRANCESCHI, Silvia. **Time since first sexual intercourse and the risk of cervical cancer**. International Journal of Cancer. V.30: 2011.

RALHAN, Ranju. *et al.* **Association between polymorphism in p21 (waf1/cip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene and human oral cancer**. Clin. Cancer Res. V. 6, p. 2440-2447, 2000.

RASTINEJAD, Farzan. *et al.* **Tumor suppression by RNA from the 3'untranslated region of alpha-tropomyosin**. Cell. V. 75, n.6, p. 1107 – 1117, 1993.

REGAN, Jennifer A; LAIMINS, Laimonis A. **Bap31 Is a Novel Target of the Human Papillomavirus E5 Protein**. Journal of Virology. V. 82, n. 20, p. 10042-10051, 2008.

RICHART, Ralph M., BARRON, Bruce A. **A follow-up study of patients with cervical dysplasia**. American Journal of Obstetrics and Gynecology. V. 105, p. 386-393, 1969.

RICHART, Ralph. M.; THOMAS, C WRIGHT Jr. **Controversies in the Management of Low-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia**. Cancer supplement. V. 71, n.4, p. 1413-1421, 1993.

RILEY, Todd. *et al.* **Transcriptional control of human p53-regulated genes**. Nature. V. 9, p. 402-412, 2008.

RODRIGUES, Flávia C.C. *et al.* **Analysis of CDKN1A polymorphisms: markers of cancer susceptibility?** Cancer genetics and cytogenetics. V. 142, n.2, p. 92-98, 2003.

ROH, Ju Won. *et al.* **p53 and p21 genetic polymorphisms and susceptibility to endometrial cancer**. Gynecologic Oncology. V. 93, n. 2, p. 499-505, 2004.

RONINSON, Igor B. **Oncogenic functions of tumour suppressor p21 (Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts**. Cancer Letters. V. 179, n. 1, p.1-14, 2002.

ROSSEAU, Marie-Claude. *et al.* **A cumulative case-control study of risk factor profiles for oncogenic and monogenic cervical human papillomavirus infections**. Cancer epidemiol Biomarkers Prev. V. 9, S.1. 9, p. 469-476, 2000.

RUESCH, Margaret N.; LAIMINS, Laimonis A. **Human papillomavirus oncoproteins alter differentiation-dependent cell cycle exit on suspension in semi-solid mediu.** Virology. V. 250, n.1, p. 19-29, 1998.

SANJOSE, Silvia. *et al.* **Age at sexual initiation and number of sexual partners in the female Spanish population Results from the AFRODITA survey.** European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. V. 140, n. 2, p. 234–240, 2008.

SANTOS, Alexandra M. *et al.* **Linking TP53 codon 72 and p21 nt590 genotypes to the development of cervical and ovarian cancer.** European Journal of Cancer. V. 42, n.7, p. 958-963, 2006.

SCHEFFNER, Martin *et al.* **The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53.** Cell. V.75, n.3, p. 495-505, 1993.

SCHEURER, M E; TORTOLERO-LUNA, G; ADLER-STORTHZ, K. **Human papilomavírus infection:biology, epidemiology and prevention.** Int J Gynecol Cancer. V.15, p. 727-746, 2005.

SHEN-GUNTHER, Jane; YU, Xin. **HPV Molecular assays: Defining analytical and clinical performance characteristics for cervical cytology specimens.** Gynecologic Oncology. V. 123, n.2, p. 263-271, 2011.

SHIOHARA, Masaaki. *et al.* **Absence of WAF1 Mutations in a Variety of Human Malignancies.** Blood. V. 84, p. 3781-3784, 1994.

SILVA, Teresinha Tenório. *et al.* **Identificação de tipos de papilomavirus e de outros fatores de risco para neoplasia intra-epitelial cervical.** Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. V. 28, n.5, p. 285-291, 2006.

SIMARD, Edgar P. *et al.* **Cancers With Increasing Incidence Trends in the United States: 1999 Through 2008. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2012.** Disponível <<http://cacancerjournal.com>>. Acesso em 17 fev. 2012, 16:20.

SKOMENDAL, Hanne. *et al.* **Aberrant Expression of the Cell Cycle Associated Proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, Cyclin D1, RB, and EGFR in Cervical Carcinomas.** Gynecologic Oncology. V. 73, n. 2, p. 223–228, 1999.

SMITH, Jennifer S. *et al.* **Evidence for Chlamydia trachomatis as a Human Papillomavirus Cofactor in the Etiology of Invasive Cervical Cancer in Brazil and the Philippines.** The Journal of Infectious Diseases.V.185, n. 3, p. 324–31, 2002.

SMITH, Jennifer S. *et al.* **Herpes Simplex Virus-2 as a Human Papillomavirus Cofactor in the Etiology Invasive Cervical Cancer.** Journal of the National Cancer Institute. V. 94, n. 21, p. 1604-1613, 2002.

SMITH, Jennifer S. *et al.* **Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review.** The Lancet. V. 361, n. 9364, p. 1159 – 1167, 2003.

SMITH, Martin L.;FORNACE, Albert J. J. **The two faces of tumor suppressor p53.** Am J Pathol. v. 148, n.4, p. 1092-1100, 1996.

SPIDEL, Daniel. **Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death.** Trends in Cell biology. V. 20, n.1, p.14-24, 2010.

STANLEY, Margaret A. **Human papillomavirus and cervical carcinogenesis.** Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. V. 15, n.5, p. 663-76, 2001.

STOEHR, R. *et al.* **Mdm2-SNP309 polymorphism in prostate cancer: no evidence for association with increased risk or histopathological tumour characteristics.** British Journal of Cancer. V.99, p. 78 – 82, 2008.

STOREY, Alan. *et al.* **Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus associated cancer.** Nature.V. 393, p. 229–34, 1998.

TALSETH, Bente A. *et al.* **MDM2 SNP309 T>G alone or in combination with the TP53 R72P polymorphism does not appear to influence disease expression and age of diagnosis of colorectal cancer in HNPCC patients.** Int J Cancer.V.120, p. 563–565, 2007.

THOMAS, M. *et al.* **HPV-18 E6 mediated inhibition of p53 DNA binding activity is independent of E6 induced degradation.** Oncogene. V. 10, n. 2, p. 261-268, 1995.

TIAN, Qifang. *et al.* **The nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms in codon 31 of p21 gene and the susceptibility to cervical cancer in Chinese women.** Int J Gynecol Cancer. V.19, n.6, p. 1011-1014, 2010.

TOFFOLI, Giuseppe. *et al.* **Effect of TP53 Arg72Pro and MDM2 SNP309 Polymorphisms on the Risk of High-Grade Osteosarcoma Development and Survival.** Clin Cancer Res. V.15, n. 10, p. 3550-3556, 2011.

TROTTIER, Helen; FRANCO, Eduardo L. **The epidemiology of genital human papillomavirus infection.** Vaccine. V. 24, Supplement 1, p. S4-S15, 2006.

TSAI, T.C.; CHEN, S.L. **The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein.** Arch Virol. V. 148, n.8, p.1445-1453, 2003.

TUREK, Lubomir P.; SMITH, Elizabeth M. **The genetic program of genital human papillomaviruses in infection and cancer.** Obstetrics and Gynecology Clinics. V. 23, n. 4, p. 735-758, 1996.

VERESS, György. *et al.* **Function significance of sequence variation in the E2 gene and long control region of human papillomavirus type 16.** Journal of General Virology. V. 80, p. 1035-1043, 1999.

VINK, Jacqueline M. *et al.* **Cervix smear abnormalities: Linking pathology data in female twins, their mothers and sisters.** European Journal of Human Genetics. V. 19, p. 108-111, 2011.

VINOKUROVA, Svetlana. *et al.* **Type-Dependent integration Frequency of Human Papillomavirus Genomes in Cervical Lesions.** Cancer Research. V. 68, n.2, p. 307-313, 2008.

VOLGELSTEIN, Bert; LANE, J. David; LEVINE, Arnold J. **Surfing the p53 network.** Nature. V.408, p. 307-310, 2000.

VOUSDEN, Karen H; LANE, David P. **p53 in health and disease.** Nature Reviews Molecular Cell Biology. V. 8, p. 275-283, 2007.

WADE, Mark; WANG, Yunyuan V; WAHL, Geoffrey M. **The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone.** Trends in Cell Biology. V. 20, n. 5, p. 299-309, 2010.

WAGATSUMA, Masako; HASHIMOTO, Katsuyuki; MATSUKURA, Toshihiko. **Analysis of integrated human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers: amplification of viral sequences together with cellular flanking sequences.** Journal of virology. V. 64, n.2, p. 813–821, 1990.

WASIELEWSKI, Marijke. *et al.* **MDM2 SNP309 accelerates familial breast carcinogenesis independently of estrogen signaling.** *Breast Cancer Res Treat.* V.104, n. 2, p.153-157, 2007.

WHIBLEY, Catherine; PHAROAH, Pail D P.; HOLLSTEIN, Monica. **p53 polymorphisms: cancer implications.** *Nature Reviews.* V. 9, p. 95-107, 2009.

WINER, Rachel L. *et al.* **Condom Use and the Risk of Genital Human Papillomavirus Infection in Young Women.** *The new England journal of medicine.* V. 354, n.25, p. 2645-2654, 2006.

WINER, Rachel L.*et al.* **Genital Human Papillomavirus Infection: Incidence and Risk Factors in a Cohort of Female University Students.** *American Journal of Epidemiology.* V.157, n.3, p. 218-226, 2003.

WOODMAN, Ciaran BJ; COLLINS, Stuart I; YOUNG, Lawrence S. **The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues.** *Nature.* V. 7, p.11-22, 2007.

WU, Erica W. *et al.* **The human papillomavirus E7 oncoprotein and the cellular transcription factor E2F bind to separate sites on the retinoblastoma tumor suppressor protein.** *Journal of Virology.* V.67, n.4, p. 2402-2407, 1993.

WU, Ming-Tsang. *et al.* **Association between p21 codon 31 polymorphism and esophageal cancer risk in a Taiwanese population.** *Cancer Letters.* V. 201, n.2, p.175-180, 2003.

XI, Ya-Guang. *et al.* **p53 polymorphism and p21^{WAF1/CIP1} haplotype in the intestinal gastric cancer and the precancerous lesions.** *Carcinogenesis.* V. 25, n.11, p. 2201-2206, 2004.

XU, Yang. **Regulation of p53 responses by post-translational modifications.** *Cell Death and Differentiation.* V. 10, p. 400–403, 2003.

ZIMMERMANN, Holger. *et al.* **Interaction with CBP/p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53.** *Journal of General Virology.* V. 81, p. 2617-2623, 2000.

ZUR HAUSEN, Harald. **Papillomavirus infections - a major cause of human cancer.** *Biochim Biophys Acta.* V. 1288, n.2, p. F55-F78, 1996.

ZUR HAUSEN, Harald. **Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis.** Journal of the National Cancer Institute. V. 92, n. 9, p. 690-698, 2000.

9. ANEXO

9.1 - QUESTIONÁRIO DE ESTUDO



L E M T E

Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental





Ficha Nº _____
 Nº Prontuário HUOC _____
 Data ____/____/____

Pesquisa (Pacientes)

I) Informações Pessoais:

Nome: _____ Idade: _____

Município: _____ Estado: _____

Zona ☐ Rural ☐ Urbana

Estado Civil: ☐ Solteira ☐ Viúva
☐ Casada ☐ Ignorado

Raça / Cor: ☐ Branca ☐ Negra ☐ Parda ☐ Amarela

II) Fatores Interferentes:

Idade da 1ª relação sexual _____
 Idade da 1ª gestação _____

Número de gestações _____
 Número de parceiros _____

Uso de anticoncepcional hormonal?
☐ Sim ☐ Não
 Qual? _____

Método contraceptivo atual
 Qual? _____

Uso atual de medicações ☐ Sim ☐ Não
 Qual? _____
 Tempo? _____

Fuma? ☐ Sim ☐ Não
 Ex-fumante ☐ Há quanto tempo _____
 Quantos cigarros/dia _____

DST? ☐ Sim ☐ Não
 Quais? ☐ HIV/AIDS ☐ Hepatite B ☐ Sífilis
☐ Outros: _____

Número de partos
 Vaginal ☐ Cesáreas ☐

Bebidas alcoólicas ☐ Nunca ☐ Sim
☐ Não agora, mas já consumi

III) Exames Preventivos:

Exame preventivo ☐ Sim ☐ Não
 Idade do 1º preventivo _____

Exame	Observação
Papanicolaú ☐ Sim ☐ Não	_____
Colposcopia ☐ Sim ☐ Não	_____
Vulvoscopia ☐ Sim ☐ Não	_____
Anuscopia ☐ Sim ☐ Não	_____

IV) Tipo de Lesão:

☐ Verruga
☐ Lesão precursora Qual? _____
☐ Câncer Qual? _____

Localização da lesão
☐ Colo ☐ Vulva ☐ Região perianal
☐ Vagina ☐ Ânus ☐ Outros _____

V) Tipo Histológico: _____

VI) Histórico de Câncer Familiar

☐ Sim ☐ Não
 Em caso de positivo – Tipo: _____
 Grau de parentesco: _____

VII) Dados Laboratoriais:

Coletas

☐ Sangue periférico – C/ EDTA (2 ml)

☐ Sangue periférico - S/ EDTA (4 ml)

☐ Cytobrush Local: _____

Genotipagem (HPV)

	Tipo
Alto-risco	_____
Médio-risco	_____
Baixo-risco	_____

Genotipagem (polimorfismos)

MBL2 _____

TP53 _____

IL-10 _____

TNF- α _____

10. MEMORIAL DO ALUNO

Nome: Carolina Maria Medeiros do Amaral

Data de nascimento: 28/03/1979

e-mail: carolinamed3@gmail.com

Curso de graduação: Bacharel em Ciências Biológicas

Colação de grau: Julho de 2006

Publicações Científicas:

1. Baldez da Silva, MFPTB ; Vilma Guimarães ; SILVA, M.A.R. ; AMARAL, Carolina Maria Medeiros Do ; BEÇAK, W. ; STOCOO, R.C. ; FREITAS, AC ; CROVELLA, S. . HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPES 16, 18, 31 AND 33: FREQUENCIES AND SITES OF CERVICAL LESIONS IN GYNECOLOGICAL PATIENTS FROM RECIFE (PE BRAZIL). Genetics and Molecular Research, 2011.