

**CARMEN REGINA NOGUEIRA DE CARVALHO**

**POLIMORFISMOS DA PROTEÍNA p53, DAS GLUTATIONAS-S-  
TRANSFERASES E O PAPILOMAVÍRUS HUMANO NO  
ADENOCARCINOMA DO COLO UTERINO**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo - Escola Paulista de  
Medicina, para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências.

**SÃO PAULO**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**CARMEN REGINA NOGUEIRA DE CARVALHO**

**POLIMORFISMOS DA PROTEÍNA p53, DAS GLUTATIONAS-S-  
TRANSFERASES E O PAPILOMAVÍRUS HUMANO NO  
ADENOCARCINOMA DO COLO UTERINO**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo - Escola Paulista de  
Medicina, para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências.

**Orientador:** Prof. Dr. Julisa Chamorro Lascasas Ribalta

**Co-orientador:** Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva

**SÃO PAULO**

**2007**

Carvalho, Carmen Regina Nogueira de  
**Polimorfismo da proteína p53, das glutathiona-s-transferase e o papillomavírus humano no adenocarcinoma do colo uterino.** /  
Carmen Regina Nogueira de Carvalho -- São Paulo, 2007.  
xv, 87f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Curso de Pós-graduação em Ginecologia.

Título em inglês: The polymorphism of the protein p53, the glutathione-s-transferase and human papillomavirus in the uterine cervix adenocarcinoma.

1. Neoplasias do Colo do Útero 2. Glutathiona-S- Transferase T1  
3. Papillomavirus humano 4. Proteína p53 5. Glutathiona-S-  
TransferaseM1.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA**

**Chefe do Departamento**

Prof. Dr. Afonso Celso Pinto Nazario

**Coordenador do Curso de Pós-Graduação**

Prof. Dr. Vilmon de Freitas

## **Dedicatória**

*Dedico esta tese aos meus pais, Maria Amélia e Sebastião  
(in memoriam) que me ensinaram a ser aquilo que sou.*

## **Agradecimento especial**

À Prof. Dr. Julisa Chamorro Lascasas Ribalta, meu reconhecimento e agradecimento. Sem sua amizade, auxílio e orientação, esta tese jamais seria realizada.

Ao Prof. Dr. Sebastião Piato, que sempre me levou pela mão me apoiou nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. José Julio de Azevedo Tedesco (*in memorian*) e Dr. José Leal de Queiroz (*in memorian*), que me orientaram com seus exemplos de dignidade e deixaram muita saudade.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva, Chefe do Laboratório de Ginecologia Molecular da UNIFESP-EPM, co-orientador dessa tese pela minha introdução ao mundo da biologia molecular.

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat, Professor Titular do Departamento de Ginecologia da UNIFESP - Escola Paulista de Medicina, pela acolhida no Departamento.

Ao Prof. Dr. Manoel João Batista Castello Girão, Professor Titular do Departamento de Ginecologia da UNIFESP - Escola Paulista de Medicina, pelas orientações na correção dessa tese.

Ao Prof. Dr. Afonso Celso Pinto Nazario, Diretor do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM, pela amizade.

Ao Prof. Dr. Vilmon de Freitas, Coordenador do Curso de Pós-Graduação do Departamento Ginecologia da UNIFESP-EPM, pela aceitação dessa tese.

À Profa. Dra. Marair Gracio Ferreira Sartório, Chefe da Disciplina de Ginecologia Geral do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM, pela amizade e sugestões na estruturação desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Nelson Valente Martins, Consultor Técnico do Laboratório de Citopatologia da Disciplina de Ginecologia Geral do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM, pelo interesse e constante estímulo.

Ao Prof. Dr. Gustavo Rubino de Azevedo Focchi, do Departamento de Patologia da UNIFESP-EPM, pela revisão histopatológica.



Às pesquisadoras do Laboratório de Ginecologia Molecular da UNIFESP-EPM, Julia S. Pereira e Naiara C. Nogueira de Souza, pela minha introdução às técnicas da biologia molecular e pela realização dos exames.

À Dra. Carla Realti, pelo auxílio na coleta de material do Grupo Controle.

À Dra. Marilene Melo, Diretora Médica do Laboratório SAE, que gentilmente permitiu coleta de material para o grupo controle desta tese.

À Dra. Helena Miller, do Laboratório CEDIG, ao Prof. Dr. João Norberto Stávale, do Departamento de Patologia da UNIFESP-EPM, ao Prof. Dr. José Donato de Próspero e Prof. Dra. Lenira Rocha Micelis, do Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, Prof. Dr. João Carlos Sampaio Góes, do Instituto Brasileiro do Controle do Câncer e Dr. Sergio Ricardo Rocha de Araújo, do Laboratório LABPAC, pelos espécimes de adenocarcinoma do grupo estudo.

As Sras. Andréia Cristina Feitosa do Carmo e Isabel Bueno Santos de Menezes, da Biblioteca Central da UNIFESP-EPM, pelas orientações da pesquisa bibliográfica e correção da bibliografia.

À Dra. Creusa Dal Bó, pela análise estatística e orientações.

À minha amiga, Ana Bracht, que auxiliou na procura dos artigos da bibliografia dessa tese.

À Karim Martins dos Santos, Secretária da Coordenação de Pós-Graduação em Ginecologia da UNIFESP-EPM e demais funcionárias do Departamento de Ginecologia, pela ajuda constante.

Aos colegas da Diretoria do Capítulo de São Paulo da Associação Brasileira de Genitoscopia, pelo interesse e estímulo constante.

Ao meu amigo e Chefe do Ambulatório de Onco-ginecologia da Disciplina de Oncologia Ginecológica do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM, Dr. Pedro Luiz Lacordia, pelo seu apoio e compreensão.

Aos colegas, pós-graduandos e funcionárias da Disciplina de Oncologia Ginecológica do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM, pela tolerância para com minhas faltas durante a realização dessa tese.

Aos colegas, pós-graduandos, estagiários e funcionárias do Núcleo de Prevenção de Doenças Ginecológicas da Disciplina de Ginecologia Geral do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM, pela solidariedade.

Aos colegas do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, com muita saudade.

Aos colegas e funcionários do Centro Médico do Hospital Santa Isabel da Santa Casa de São Paulo, pela amizade.

Às minhas irmãs, cunhados e amigos Tete e Pedro, Mariângela e Luiz, Anna Maria e Valdir, Sonia e Francisco, Regina e Joaquim, Venir e Ayrton, Andréia e Maria Tereza, Bruna, Maria Inês, Dora e Marizi, pelo carinho e apoio constantes.

À minha auxiliar de todas as horas, Marlene Pereira, sempre presente nos momentos importantes.

*“Não se sabe tudo, nunca se saberá tudo, mas há horas em que somos capazes de acreditar que sim, talvez porque nesse momento nada mais nos podia caber na alma, na consciência, na mente, naquilo que se queira chamar ao que nos vai fazendo mais ou menos humanos.”*

*(José Saramago, 2006)*

## Sumário

Dedicatória.....	iv
Agradecimento especial.....	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Quadros.....	xii
Lista de Anexos.....	xiii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xiv
Resumo.....	xv
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>3. PACIENTES E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1 Pacientes.....	19
3.2 Métodos.....	20
3.2.1 Método de seleção do grupo estudo.....	20
3.2.2 Método de seleção do grupo controle.....	22
3.2.3 Método histopatológico.....	24
3.2.4 Método citológico.....	24
3.2.5 Métodos biomoleculares.....	24
3.2.6 Método Estatístico.....	30
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>56</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
Abstract	
Bibliografia consultada	

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b>	Gel de agarose demonstrado a presença de HPV em 160pb utilizando-se os primers GP5 e GP6 em amostra de adenocarcinoma cervical.....	26
<b>Figura 2.</b>	Gel de agarose demonstrando a presença das três isoformas da p53 em 177pb e 141 pb.....	27
<b>Figura 3.</b>	Gel de agarose demonstrando da isoforma da GSTM1 em 218 pb.....	28
<b>Figura 4.</b>	Gel de agarose demonstrando da presença da GSTT1 em 459bp.....	29
<b>Figura 5.</b>	Distribuição da presença do DNA-HPV nos grupos estudo e controle....	35
<b>Figura 6.</b>	Distribuição das isoformas da proteína p53 nos grupos estudo e controle	36
<b>Figura 7.</b>	Distribuição da associação da presença viral com isoformas da proteína p53 no códon.....	37
<b>Figura 8.</b>	Distribuição dos alelos GSTM1 e GSTM1*0 nos grupos estudo e controle 45.....	38
<b>Figura 9.</b>	Distribuição da associação da presença viral com alelos da família GSTM1 nos grupos estudo e controle.....	39
<b>Figura 10.</b>	Distribuição da associação das isoformas da proteína p53 com alelos da família GSTM1 nos grupos estudo e controle.....	40
<b>Figura 11.</b>	Distribuição dos alelos GSTT1 e GSTT1*0 nos grupos de estudo e controle.....	41
<b>Figura 12.</b>	Distribuição da associação da presença viral com alelos da família GSTT1 nos grupos estudo e controle.....	42
<b>Figura 13.</b>	Distribuição da associação das isoformas da proteína p53 com alelos da família GSTT1 nos grupos estudo e controle.....	43

## Lista dos Quadros

<b>Quadro 1.</b>	Distribuição dos casos de adenocarcinoma blocados em parafina segundo número de ordem, serviço de origem, nome, idade, número do bloco, resultado do exame anatomopatológico e tipo histológico.....	21
<b>Quadro 2.</b>	Distribuições dos casos controle de mulheres sem de neoplasia cervical, segundo número de ordem, serviço de origem, número do registro, nome, idade, resultado dos exames citopatológico e colposcópico.....	23
<b>Quadro 3.</b>	Distribuição dos casos Estudo segundo identificação, idade, presença de HPV e variantes dos polimorfismos de p53, GSTM1 e GSTT1.....	33
<b>Quadro 4.</b>	Distribuição dos casos Controle segundo identificação, idade, presença de HPV e variantes dos polimorfismos de p53, GSTM1 e GSTT1.....	34

## Lista de Anexos

<b>Anexo 1.</b>	Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	57
<b>Anexo 2.</b>	Carta da UES de Anatomia Patologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.....	58
<b>Anexo 3.</b>	Carta do Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.....	59
<b>Anexo 4.</b>	Carta do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer.....	60
<b>Anexo 5.</b>	Carta do Laboratório Centro de Diagnóstico de Guarulhos.....	61
<b>Anexo 6.</b>	Carta do Laboratório LABPAC.....	62
<b>Anexo 7.</b>	Carta do Laboratório SAE.....	63
<b>Anexo 8.</b>	Termo de Consentimento Pós-informado.....	64

## Lista de abreviaturas e símbolos

A/A – arginina / arginina	GST-T1*0 – Alelo nulo da Glutathione-S-transferase T1
ABC = <i>ATP-binding cassette</i> – Caixa de ligação da adenosina trifosfato	GST-Z - Família Glutathione-S-transferase Z
A/P – arginina / prolina	HA3 – Região flanqueadora do gene GSTT1
ARG/PRO - arginina / prolina	HA5 – Região flanqueadora do gene GSTT1
ARG – arginina	HPV – Papilomavírus humano
C – citosina	IARC – Agência Internacional para Pesquisa do Câncer
CCC – citosina – citosina – citosina	kb – quilo-base
CGC - citosina – guanina – citosina	kDa – quilo-Dalton
CYP450 – citocromo P450	M – mitose
DNA – ácido desoxirribonucléico	MAPEG – proteínas de membrana associadas ao metabolismo de ecosanóide e glutathione
E2F – fator de transcrição do ciclo de divisão celular entre as fases G1 e S	p53 – proteína do gene TP53
G – Guanina	P/P – prolina/prolina
G1 – Intervalo 1 do ciclo de divisão celular	P72 - prolina
G2 – Intervalo 2 do ciclo divisão celular	PRO – prolina
G0 – fase de repouso do ciclo de divisão celular	PRO/PRO - prolina /prolina
<i>Gap</i> – Intervalo	pRb – proteína do gene supressor de tumores RB (retinoblastoma)
GSH – Glutathione	pRB-E2F – complexo que impede progressão do ciclo de divisão celular da fase G1 para fase de síntese de DNA
GST – Glutathione-S-transferase	R 72 – arginina
GST-A - Família Glutathione-S-transferase A	RB – gene supressor de tumores (retinoblastoma)
GST-M – Família Glutathione-S-transferase M	R/P - arginina / prolina
GST-M 1 – Família Glutathione-S-transferase M1	S – fase de síntese de DNA no ciclo de divisão celular
GST-M 1*A – Alelo 1*A da Glutathione-S-transferase M1	SLC – carregador de soluto
GST-M 1*B – Alelo 1*B da Glutathione-S-transferase M1	SNP – polimorfismo de nucleotídeo único
GST-M1*0 – Alelo nulo da Glutathione-S-transferase M1	TP53 – Gene supressor de tumores – “Guardião do Genoma”
GST-O - Família Glutathione-S-transferase O	TP63 – Gene da família TP53
GST-P - Família Glutathione-S-transferase P	TP73 - Gene da família TP53
GST-S - Família Glutathione-S-transferase S	VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular
GST-T - Família Glutathione-S-transferase T	
GST-T1 – Família Glutathione-S-transferase T1	
GST-T 1*A – Alelo 1*A da Glutathione-S-transferase T1	
GST-T 1*B – Alelo 1*B da Glutathione-S-transferase T1	



## Resumo

**Objetivo:** Analisar os polimorfismos da proteína p53 no códom 72, as famílias das enzimas metabolizantes GSTM1 e GSTT1 e o Papilomavírus humano (HPV) na carcinogênese do adenocarcinoma do colo uterino. Casuística e Métodos: O estudo caso-controle envolve 43 amostras de adenocarcinoma do colo uterino fixados e bloqueados em parafina pertencentes ao grupo estudo e 86 amostras de células endocervicais, coletadas com escova endocervical, de mulheres sem tumor cervical pertencentes ao grupo controle. A demonstração da presença do HPV, polimorfismo da p53, da enzima GSTM1, de seu alelo nulo GSTM1\*0, da GSTT1 e de seu alelo nulo GSTT1\*0 foi realizada utilizando-se a reação em cadeia da polimerase. **Resultados:** A média de idade do grupo estudo foi 52,49 anos e a do grupo controle foi 48,07 anos. O teste t de Student ( $p=0,1042$ ) (IC de 95%) mostrou homogeneidade entre os dois grupos. O HPV esteve presente em 42(97,67%) dos casos do grupo estudo e em 27(31,40%) dos controles. A análise estatística confirmou diferença significativa ( $p=0,001$ ) (IC de 95%) e razão de chances foi de 113,79 vezes (IC de 95%:13,671; 945,145) ( $p<0,001$ ). As análises da presença das isoformas da p53, da associação do HPV e alelos da p53 realizados entre os dois grupos não apresentaram significância estatística. Da mesma forma a presença das GSTM1 e GSTM1\*0, suas associações com HPV e isoformas da p53 não foram estatisticamente significantes. Por sua vez a análise de GSTT1 e GSTT1\*0 pelo teste do  $\chi^2$  foi significativa  $p=0,001$  (IC de 95%) e a razão de chances foi de 4,58 vezes (IC de 95%:2,04; 10,28) ( $p<0,001$ ). As associações de GSTT1 e GSTT1\*0 com HPV evidenciaram  $p<0,001$ (IC de 95%). A razão de chances da GSTT1\*0 foi de 6,67 vezes (IC de 95%: 1,99; 22,17) ( $p<0,001$ ). Por outro lado, a razão de chances de GSTT1 foi de 0,15(IC de 95%:0,045; 0,502) ( $p<0,0021$ ). A associação de GSTT1 e GSTT1\*0 com as isoformas da p53 não foram estatisticamente significantes ( $p=0,056$ ) (IC de 95%). A análise da associação das famílias GSTM1 e GSTT1, por modelo de regressão logística, mostrou que a família GSTM1 não era um fator prognóstico no adenocarcinoma cervical nem isolada, nem associada à família GSTT1. **Conclusões:** O HPV estava presente em 97,67% dos adenocarcinomas, e associou-se com aumento do risco de 113,79 vezes para a carcinogênese do adenocarcinoma, enquanto a presença de GSTT1\*0 mostrou risco para adenocarcinoma de 4,58 vezes. A sua associação com HPV aumentou o risco em adquirir adenocarcinoma para 6,67 vezes. A presença de GSTT1 ofereceu proteção contra a carcinogênese do adenocarcinoma. As isoformas da p53 e a família GSTM1 não participaram da carcinogênese do adenocarcinoma do colo uterino na população estudada.

## 1. INTRODUÇÃO

---

O avanço nas pesquisas biomoleculares possibilita o uso de suas técnicas em estudos epidemiológicos. A partir das últimas décadas do século XX, a epidemiologia molecular tem permitido a elucidação de doenças crônicas, entre elas o câncer (Caporaso, 2003; Lang, 2004; Chen, Hunter, 2005).

Esses estudos revelam diferenças na prevalência e na severidade da doença tanto inter quanto intra populações expostas a um mesmo agente infeccioso. Evidencia-se assim, componente genético na variação da suscetibilidade às moléstias infecciosas (Clementi, Di Gianantonio, 2006).

A identificação de regiões de genes em indivíduos mais sensíveis ou não, a um determinado agente ou tipo de câncer, transmitidos para suas proles, motiva o estudo dos polimorfismos gênicos (Rothman et al., 2001; Taioli et al., 2004; Suh, Vijg, 2005).

O termo polimorfismo é utilizado para designar variações em um determinado gene, herdadas e transmitidas, não em indivíduo único, mas em uma parcela da população. Essas variações não causam síndromes genéticas, mas sensibilizam ou protegem pessoas a várias moléstias, ou tornam parcelas de populações resistentes a alguns medicamentos, como por exemplo, quimioterápicos (Beeghly et al., 2006; Clementi, Di Gianantonio, 2006).

As modificações estruturais no ácido desoxirribonucléico (DNA) podem ser complexas, tais como repetições de micro-satélites, inserções, inversões e deleções de pequenos segmentos. A simples troca de um nucleotídeo por outro, conhecida como polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), é a ocorrência mais freqüente (Cargill et al., 1999; Crawford, Nickerson, 2005; MacAuley, Ladiges, 2005;).

O genoma é constituído por DNA compactado nos cromossomos que contêm regiões gênicas codificadoras, os éxons, e regiões não codificadoras ou controladoras, os íntrons. Essas regiões distribuem-se em *loci* que albergam os códons. Estes são representados pelas tríades de nucleotídeos, cuja função é conduzir a formação de determinado aminoácido. Os códons de cada cadeia de DNA pareiam-se em alelos.

---

Os polimorfismos podem ocorrer nos íntrons ou nos éxons. Os SNP podem ser nomeados como sinônimos ou não sinônimos segundo alteração ocorrida (Romero et al., 2002; Crawford, Nickerson, 2005; Gibbs, Singleton, 2006). Quando a troca de um nucleotídeo não altera a expressão final, ou seja, o aminoácido correspondente ao códon modificado, diz-se ocorrer polimorfismo de nucleotídeo único sinônimo. Caso contrário será não sinônimo (Rebbeck et al., 2004).

Para uma alteração ser chamada de polimorfismo, sua forma mais freqüente deve estar presente em até aproximadamente 95% dos indivíduos de um grupo populacional. As outras formas devem corresponder aos 5% restantes desse grupo populacional (Romero et al., 2002).

A suscetibilidade variável a diferentes tipos de câncer, a presença de metástases precoces ou não, os diferentes prognósticos de um mesmo tipo de lesão e a resistência a antitumorais parecem estar associados à ocorrência de polimorfismos (Strange et al., 1998; Kawaguchi et al., 2000; D'Alo et al., 2004; Depeille et al., 2004; Gemmati et al., 2004; De Rijke et al., 2005; Hung et al., 2005; Chung et al., 2006; Crawford et al., 2006; Goodman et al., 2006; Lecomte et al., 2006; Li et al., 2006).

Variações da proteína p53, do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), das citocinas inflamatórias, da ciclina D1, enzimas metabolizadoras, são exemplos de polimorfismos (Medeiros et al., 2004; Zheng et al., 2004; Jacobs et al., 2006; Knudsen et al., 2006; Sansbury et al., 2006).

## **1.1 Proteína p53**

O gene TP53 situa-se no braço curto do cromossomo 17, no *locus* 13.1 (17p13.1), é composto por 12,5 kb, sua massa é de 43,5 kDa e apresenta 11 éxons. Pertence a uma família de genes altamente conservados, que contém outros dois genes, o TP63 e o TP73 (Hesketh, 1995; Moura Gallo et al., 2005).

Quando descoberto, foi considerado um oncogene, sendo posteriormente identificado como gene supressor de tumores. Por desempenhar

---

papel chave na resposta celular aos danos no DNA, foi cognominado guardião do genoma. Grande importância lhe é atribuída na gênese de vários tipos de câncer (Hesketh, 1995; May, May, 1999).

O gene TP 53 codifica uma fosfoproteína com massa de 53kDa, a p53, conhecida como selvagem quando não apresenta mutações. O bloqueio da progressão do ciclo celular e o início da cadeia da apoptose, são suas funções (Volgestein, Kinzler, 1992; May, May, 1999; Coultas, Strasser, 2000; Haupt et al., 2003).

O processo de divisão celular, também conhecido como ciclo celular, é composto por quatro fases: fase de síntese do DNA (S), mitose propriamente dita (M) e os intervalos (*Gap*) entre as duas anteriores: G1, fase inicial do ciclo e de preparo para a síntese do DNA e G2, quando a célula capacita-se para a mitose. Quando uma célula completa o ciclo celular, pode voltar a se dividir, entrar novamente em G1, ou permanecer quiescente em fase de repouso temporário (G0), ou ainda evoluir para diferenciação (Pollok et al., 2003; Krude, 2006).

Na evolução do ciclo celular existem mecanismos rígidos de controle, dispostos nas várias etapas. Sua função é fiscalizar a seqüência dos eventos celulares inerentes a cada fase e são conhecidos como pontos de verificação. No encontro de qualquer transtorno, o ciclo celular é interrompido. O principal ponto de verificação encontra-se próximo ao final da fase G1 e é denominado ponto de restrição, nas células eucarióticas (Zhou, Elledge, 2000; Canman, 2001; Murray, 2004; Sánchez, Dynlacht, 2005).

Quando existe qualquer tipo de alteração no conteúdo gênico a p53, por meio de mecanismo complexo, retira a célula do ciclo celular fazendo com que permaneça em G0. Após o dano ao DNA ter sido reparado, essa célula poderá retornar ao ciclo, caso contrário ficará quiescente até a senescência ou será dirigida para morte celular programada, a apoptose, também desencadeada pela p53 (Coultas, Strasser, 2000; Pietenpol, Stewart, 2002; Weinberg, Denning, 2002; Vermeulen et al., 2003). A proteína p53 também pode promover o bloqueio do ciclo em G2 (Nakamura et al., 2002).

---

A proteína p53 apresenta vários polimorfismos distribuídos na população. Nos éxons 2, 4 e 6 podem ser vistos polimorfismos sinônimos nos quais, não há alteração da seqüência de aminoácidos. Nas regiões promotoras não codificadoras e nos íntrons: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9 e 10 são descritos polimorfismos. Os polimorfismos não sinônimos, onde a seqüência dos aminoácidos é alterada, são narrados no éxon 4, nos códons 47 e 72 (Olivier et al., 2002).

Estudos sobre a p53 humana, desenvolvidos por Harris et al. (1986), Matlashewski et al. (1987) e Buchman et al. (1988), tanto em tecido normal quanto em tumores, evidenciaram polimorfismos dos alelos de seu gene codificador em aproximadamente 10% dos casos.

A clonagem molecular e o seqüenciamento de ambos os alelos do gene TP53 revelam nessa oportunidade, alteração no códon 72. Nessa posição há substituição da citosina (C) central da trinca CCC, codificadora do aminoácido prolina (PRO), por guanina (G) formando a seqüência CGC que codifica o aminoácido arginina (ARG), caracterizando um SNP não sinônimo. Ambos os alelos podem ser homozigotos: Arginina/Arginina (ARG/ARG ou R72) e prolina/prolina (PRO/PRO ou P72) ou heterozigotas funcionais arginina/prolina (ARG/PRO ou R/P) (Matlashewski et al., 1987; Buchman et al., 1988; Pietsch et al., 2006).

A proteína E6 do Papilomavírus Humano (HPV), de baixo ou de alto risco oncogênico, condiciona maior degradação, dependente da ubiquitina, do alelo ARG quando comparada com o PRO. A variante ARG é mais supressora da transformação celular, atividade associada à função apoptótica da p53. Estudos mostram que, em tumores de indivíduos heterozigotos para p53, o alelo ARG está mais sujeito à mutação enquanto o alelo PRO é mais comumente perdido por deleção (Storey et al., 1998; Mantovani, Banks, 1999; Tommasino et al., 2003; Pietsch et al., 2006).

Na análise da p53 em carcinoma espinocelular do colo uterino Storey et al. (1998), demonstraram predomínio de homozigose da arginina (ARG/ARG) quando comparado a tecidos sem neoplasia. Esses autores informaram, ainda que mulheres com a isoforma da p53 ARG/ARG infectadas pelo HPV de alto risco oncogênico, têm probabilidade sete vezes maior de desenvolver carcinoma espinocelular do colo uterino do que as demais.

---

O fato causou controvérsias, alguns autores não conseguiram a reprodução desses achados ao analisarem carcinomas espinocelulares do colo uterino (Hayes et al., 1998; Helland et al., 1998; Hildesheim et al., 1998; Josefsson et al., 1998; Minaguchi et al., 1998; Rosenthal et al., 1998 Yamashita et al., 1999; Dimitrakakis et al., 2000; Malcolm et al., 2000; Tenti et al., 2000; Rezza et al., 2001; Cenci et al., 2003; Cho et al., 2003; Jee et al., 2003; Santos et al., 2005; Ueda et al., 2006).

Outros obtiveram resultados concordantes com essa associação, porém, não com a mesma intensidade. Em geral, o risco relativo, em homozigóticas para ARG, portadoras da infecção HPV, de gerar um carcinoma espinocelular do colo uterino variava de 1,5 a 2,5 vezes. Essa associação não era reproduzida nas neoplasias intra-epiteliais escamosas e parecia estar relacionada aos tumores espinocelulares invasivos (Zehbe et al., 1999; Dokianakis, Spandidos, 2000; Madeleine et al., 2000; van Duin et al., 2000; Klug et al., 2001; Zhebe et al., 2001; Nagpal et al., 2002; Koushik et al., 2005; Gudleviciene et al., 2006).

Os alelos da p53 também estão implicados na carcinogênese de outros tipos de tumores, nos quais o aumento do risco relativo está associado ao genótipo PRO/PRO (Wang et al., 1999; Yu et al., 1999; Brooks et al., 2000; Fan et al., 2000; Kawaguchi et al., 2000; Pierce et al., 2000; O'Connor et al., 2001; Liu et al., 2001; Furihata et al., 2002; Tsai et al., 2002; Tommiska et al., 2005; Tornesello et al., 2005; Zhu et al., 2005; Sul et al., 2006).

## **1.2 Glutathiona-S-Transferase**

Todo ser vivo é constantemente exposto a compostos químicos estranhos ao organismo, os xenobióticos, assim como às substâncias produzidas pelo próprio organismo, os endobióticos. Alguns xenobióticos são produtos naturais que participam da ação recíproca entre as várias espécies. Outros, tanto naturais quanto sintéticos, são potencialmente tóxicos tais como poluentes ambientais, tabaco, aflotoxinas, herbicidas, drogas quimioterápicas entre outros (Coleman et al., 1997; Hart et al., 1999; Chen, Hunter, 2005).

---

Muitos desses elementos químicos podem ser carcinógenos para uma determinada espécie e não para outras. A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) por meio de estudos epidemiológicos, identificou substâncias, misturas e tipos de exposição classificados como carcinógenos para humanos. A maioria das substâncias químicas citadas pela IARC não são carcinógenos *per se* e devem ser metabolizados para que possam exercer tal função (Wogan et al., 2004).

Existem diferenças de pessoa para pessoa no metabolismo de drogas e carcinógenos devido a fatores genéticos e ambientais. Muitos estudos têm demonstrado polimorfismos nos genes que expressam as enzimas participantes desse processo, que podem levar a alteração no metabolismo de um determinado quimioterápico, por exemplo, Wogan et al. (2004).

Para facilitar o metabolismo, dar proteção contra a exposição aos xenobióticos assim como de alguns endobióticos e facilitar sua excreção, existem as enzimas metabolizadoras, historicamente divididas em duas categorias: enzimas das fases I e fase II e também os transportadores da fase III (Nishimura, Naito, 2005; Xu et al., 2005; Shimada, 2006).

As enzimas da fase I são caracterizadas pelo metabolismo oxidativo que, dependendo da substância, pode resultar em ativação ou desativação farmacológica, ter excreção facilitada e ou adição de grupos reativos para subsequente conjugação com as enzimas fase II. Fazem parte deste grupo a família do citocromo P450, as monoxigenases contendo flavina e as desidrogenases do álcool, entre outros (Hines, McCarver, 2002; Ingelman-Sundberg, 2002; Xu et al., 2005).

As enzimas da fase II são caracterizadas por conjugar os xenobióticos ou os endobióticos às substâncias orgânicas de baixo peso molecular, doadores de moléculas como a glutatona, a uridina difosfato-ácido glicurônico e acetil coenzima A para detoxificá-las, facilitar sua excreção ou estocagem. Entre as enzimas da fase II encontram-se: as glutationas-S-transferases, as N-acetiltransferases, as uridinas difosfato-glicuronosiltransferases, as epóxido hidrolases e as sulfotransferases (McCarver, Hines, 2002; Sheweita, Tilmisany, 2003; Shimada, 2006).

---



Os transportadores da fase III desempenham função vital nos processos de absorção, distribuição e excreção das substâncias resultantes das fases I e II do metabolismo tais como: aminoácidos, lipídios, íons inorgânicos, proteínas, sacarídeos, metais, drogas e xenobióticos tóxicos. Fazem parte desse grupo os transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) e os transportadores SLC (*Solute Carrier*) (Nishimura, Naito, 2005; Xu et al., 2005).

As glutatona transferases, que tradicionalmente são também denominadas de glutatona-S-transferases (GST), fazem então, parte de uma superfamília de enzimas metabolizadoras fase II (Hayes et al. 2005; Nishimura, Naito, 2006).

A glutatona (GSH) é um composto tiol por conter uma sulfidril (S-H) em sua molécula. Sua função reside na proteção das células de efeitos letais do metabolismo de xenobióticos. As células durante o metabolismo aeróbico geram, por exemplo, espécies de oxigênio reativo que, apesar de transitórias, possuem alta reatividade e resulta em peroxidação de lipídios, oxidação de proteínas e do DNA, comprometendo a vitalidade celular. A GSH em estado reduzido atua na degradação de espécies de oxigênio, enxofre e nitrogênio reativos (Jefferies et al., 2003; Sheweita, Tilmisany, 2003; Hayes et al., 2005).

O papel fundamental das GST é na detoxificação de compostos endógenos e exógenos, por catalisar a conjugação da GSH em forma reduzida, com compostos não polares que contêm centro eletrofílico de átomos de carbono, nitrogênio ou enxofre. Desse modo, há formação de derivados não tóxicos e mais solúveis prontos para serem excretados, ou transportados e estocados por transportadores da fase III do metabolismo. (Coleman et al., 1997; Frova, 2006; Nishimura, Naito, 2006).

Entre os substratos das GST estão, por exemplo, os nitrobenzenos alógenos, as quinonas e as carboxilas insaturadas  $\alpha$  e  $\beta$ . Portanto, as GST são conhecidas por catalisar reações de carcinógenos, de poluentes ambientais e drogas quimioterápicas, detoxificando-os. As GST são consideradas enzimas conservadas na evolução das espécies, em relação à resposta celular ao estresse oxidativo. Ao lado disso, parecem tomar parte da síntese de prostaglandinas e hormônios esteróides (Strange et al., 1998; Townsend, Tew, 2003; Hayes et al., 2005; Oakley, 2005; Lecomte et al; 2006).

---

Existem três grandes famílias de GST distribuídas na natureza, a saber: a citosólica, a mitocondrial e a das proteínas de membrana, associadas ao metabolismo de eicosanóides e glutatona (MAPEG). As substâncias eicosanóides são biologicamente ativas, derivadas do ácido araquidônico, que incluem as prostaglandinas e leucotrieno (Jefferies et al., 2003; Habdous et al., 2004; Hayes et al., 2005).

Em humanos existem sete famílias de GST do grupo citosólico, conhecidas pelas letras gregas alfa (GST-A), mu (GST-M), ômega (GST-O), pi (GST-P), sigma (GST-S), teta (GST-T) e zeta (GST-Z) (Hayes et al., 2005; Parl, 2005; McIlwain et al., 2006).

A família GST-M localiza-se no braço curto do cromossomo 1 no *locus* 13.3 (1p13.3) e possui cinco isoformas ou subfamílias GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4 e GSTM5 (Zhong et al., 1993; Parl, 2005; McIlwain et al., 2006).

O gene GSTM1 é composto por oito éxons e possui três alelos GSTM1\*A, GSTM1\*B e GSTM1\*0. Os dois primeiros diferem pela substituição da base guanina por citosina no nucleotídeo 534 do éxon 7, de modo que, na posição 172 da enzima há substituição de uma lisina (GSTM1\*A) por aspargina (GSTM1\*B) (Zhong et al., 1993; Xu et al., 1998; Parl, 2005).

O terceiro alelo (GSTM1\*0) é resultado de permuta desigual entre os *locus* da GSTM1 e GSTM2, que estão próximos fisicamente e compartilham 99% da seqüência dos nucleotídeos, com isso há deleção de 15 kb que contém todo gene GSTM1 (Xu et al., 1998; Habdous et al., 2004; Parl, 2005; McIlwain et al., 2006).

Os indivíduos portadores desse alelo nulo (GSTM1\*0) parecem ter associação ao maior risco de câncer de pulmão, cólon, bexiga e à melhor resposta a quimioterápicos no tratamento de leucemia, embora haja controvérsias (Rebbeck, 1997; Egan et al., 2004; Medeiros et al., 2004; McGrath et al., 2006; Ye et al., 2006).

A família GST-T localiza-se no braço longo do cromossomo 22 no *locus* 11.2 (22q11-2) e possui duas isoformas ou subfamílias GSTT1 e GSTT2 separadas por 50kb (Pemble et al., 1994; Coggan et al., 1998; Sprenger et al., 2000; Habdous et al., 2004).

---

O gene GSTT1 é formado por cinco éxons e, como o gene GSTM1 apresenta três alelos GSTT1\*A, GSTT1\*B e GSTT1\*0 ou alelo nulo. Os dois primeiros resultam da troca da base adenina por citosina no nucleotídeo 310 do éxon 3, que muda o aminoácido treonina (GSTT1\*A) do resíduo 104 para prolina (GSTT1\*B). O gene GSTT1 está colocado em uma região de extensa homologia e é flanqueado por duas regiões de 18kb denominadas de HA3 e HA5, que possuem na região central de cada uma, 403 pb com 100% de identidade. A recombinação dos 403pb da direita com os da esquerda resulta em deleção de 54kb, contendo o gene GSTT1 inteiro; como resultado surge o alelo GSTT1\*0 ou alelo nulo (Sprenger et al., 2000; Alexandrie et al., 2002; Parl, 2005).

Os indivíduos portadores desse genótipo nulo exibem atividade catalítica diminuída, que pode estar associada a risco aumentado para desenvolvimento de câncer (Rebbeck, 1997; Duell et al., 2002; Chen et al., 2004; Lai et al., 2004).

Vários autores demonstraram ou refutaram a participação dos alelos GSTM1\*0 e/ou da GSTT1\*0 promovendo maior suscetibilidade para neoplasias intra-epiteliais e para carcinoma espinocelular do colo uterino associados ou não aos polimorfismos da p53 (Goodman et al., 2001; Au et al., 2003; Ueda et al., 2003; Lee et al., 2004; Sharma et al., 2004).

As participações das enzimas metabolizadoras na carcinogênese do vários tipos de tumores, também têm sido avaliadas. Tanto a GSTM1/GSTM1\*0 quanto a GSTT1/GSTT1\*0, isoladamente ou associadas estariam relacionada à carcinogênese, e/ou aumento de risco para tal eventualidade, e/ou da sobrevida associadas ou não ao citocromo p450, à proteína p53 e ao tabagismo em tumores como os de bexiga, cérebro, colon, laringe, mama, ovário, pâncreas, próstata, pulmão, leucemia do adulto e de crianças (Moisio et al., 1998; Davies et al., 2000; Baxter et al., 2001; Howells et al., 2001; Liu et al., 2001; Mitrinen et al., 2001; Sprudle et al., 2001; Miller et al., 2002; Takanashi et al., 2003; Ocku et al., 2004; Roodi et al., 2004; Tsabouri et al., 2004; Cáceres et al., 2005; Garcia-Closas et al., 2005; Komiya et al., 2005; Lourenço et al., 2005; Pinarbasi et al., 2005; Sreeja et al., 2005; Srivastava et al., 2005; Huang et al., 2006).

---

Por outro lado, há publicações em que estas enzimas não aumentam o risco ou nem participam da carcinogênese de outros tumores, como de cabeça e pescoço, colorretais, gliomas em adultos, leucemias mielóides crônicas, mama, ovário, próstata e pulmão (Hengstler et al., 1998; Geisler, Olshan, 2001; Vogl et al., 2004; Wrensch et al., 2004; Lüchtenborg et al., 2005; Ntais et al., 2005).

### **1.3 Adenocarcinoma**

Os adenocarcinomas do colo uterino são tumores pouco conhecidos quando comparados à variedade espinocelular (Altekruse et al., 2003).

Os registros do *Surveillance, Epidemiology and Ends Results* (SEER) dos Estados Unidos, estudados por Smith et al. (2000), demonstram que entre 1973 e 1977, a incidência dessa neoplasia maligna foi de 1,34/100.000 mulheres. Já, no período de 1993 a 1996, o índice encontrado por esses autores, foi de 1,7/100.000 mulheres, evidenciando aumento estatisticamente significativo de 22,5%.

A proporção de adenocarcinomas relativa à população feminina em risco, também aumentou 49,3% das vezes. Em relação a todas as variedades de cânceres cervicais uterinos, houve elevação de 107,4% dos casos de adenocarcinoma, entre os períodos 1973 a 77 e 1993 a 96 (Smith et al., 2000).

O estudo populacional desenvolvido por Alfsen et al. (2000), demonstrou aumento dos adenocarcinomas endocervicais, em especial do tipo endometrióide.

Consoante Zheng et al. (1996), ocorreu aumento da incidência dos adenocarcinomas com significância estatística, com índices de 4,3% ao ano, entre as mulheres nascidas após o ano de 1935, tanto em brancas quanto em negras.

Segundo Sasieni, Adams (2001), observando mulheres nascidas no início dos anos 60, o risco relativo para desenvolver adenocarcinoma do colo uterino é 14 vezes maior do que para as nascidas antes de 1935.

Nota-se, ainda aumento de incidência tumoral entre mulheres com menos de 30 anos (Peters et al., 1986; Herbert, et al., 2001; Bulk et al., 2003).

---

A sobrevida de portadoras de doença locorregional, com tipo histológico espinocelular é pouco maior e estatisticamente significante quando comparada com a de portadoras de adenocarcinoma (Smith et al., 2000).

As variedades histopatológicas encontradas nos adenocarcinomas invasivos compreendem, de acordo com Zaino (2000), adenocarcinoma mucinoso sub-tipados em endocervical, intestinal, em anel de sinete; carcinoma endometrióide, carcinoma de células claras, carcinoma viloglandular, adenocarcinoma de desvio mínimo, também chamado de adenoma maligno ou adenocarcinoma extremamente bem diferenciado. Carcinoma seroso, adenocarcinoma mesonéfrico, carcinoma de células adenóide basais complementam os demais tipos histopatológicos encontrados.

#### **1.4 Carcinogênese Cervical**

A compreensão do mecanismo da carcinogênese no colo uterino inicia-se com a demonstração do Papilomavírus Humano (HPV) como agente etiológico dos condilomas genitais a partir dos estudos realizados por Meisels, Fortin (1976); Meisels et al. (1977) e Purola, Savia (1977). Estudos epidemiológicos confirmaram que o HPV é o fator causal do câncer de colo uterino associado a vários cofatores (Eluf-Neto et al., 1994; Walboomers et al., 1999; Haverkos et al., 2000; Schiffman, Castle, 2003; Danaei et al., 2005).

A neoplasia cervical apresenta características comuns aos cânceres que se seguem às infecções virais, de acordo com a teoria de zur Hausen (1991). Somente pequeno número dos indivíduos com determinada infecção viral desenvolve tumor maligno. As estimativas do período de latência entre a infecção primária pelo HPV e o aparecimento da neoplasia mostram que o processo requer anos ou mesmo décadas de contínua interação entre a célula hospedeira e o vírus. Mais ainda, o tumor resultante é monoclonal (Franco et al., 1999; Guo et al., 2000; Muñoz, 2000; Bosch et al., 2002; el Hamidi et al., 2003; Trottier, Franco, 2006).

---

O HPV é um parasita bem adaptado, que permanece intimamente associado a seus hospedeiros por longo tempo. Estudos filogenéticos sugerem que os diversos tipos de HPV estavam presentes em primatas pré-humanos e os *Homo sapiens* carregam uma fração desses tipos (Chan et al., 1992; Bernard, 2005; Calleja-Macias et al., 2005).

O HPV é vírus DNA pertencente à família Papovaviridae, possui forma icosaédrica não envelopada com 72 capsômeros com 55µ de diâmetro. Seu genoma é circular, composto por dupla fita de DNA com comprimento de 7.900 pb e massa de 5.000 kDa. Apresenta nove janelas de leitura (ORF), onde estão os sete genes de ação precoce (*early*), E1 a E7, além de dois de atuação tardia (*late*), L1 e L2, e mais uma região não codificadora, que controla a transcrição das demais regiões, a LCR (*large control region*) (Villa, 1997; Carr, Gyorfí 2000).

Consta como funções dos genes mencionados, serem E1 responsável pela replicação episomal; E2 regula negativamente a transcrição de E6 e E7; E4 possui expressão tardia e produz uma proteína secundária do capsídeo viral; E5 induz a proliferação da célula hospedeira com ação semelhante ao fator epidermal de crescimento. O gene E6 expressa a proteína E6 que interage com a proteína p53 no ciclo celular, destruindo-a via sistema ubiquitina; enquanto E7 codifica a proteína E7 que inativa a proteína RB da célula hospedeira a qual, em casos de dano ao DNA, participa do bloqueio do ciclo celular em G1. O gene L1 sintetiza a proteína principal do capsídeo viral e L2 expressa a proteína secundária desse capsídeo (Villa, 1997; Carr, Gyorfí 2000; Francis et al., 2000; Wilson et al., 2002; Burd, 2003; Cooper et al., 2003; Genter et al., 2003; Motoyama et al., 2004).

O ciclo do HPV na célula hospedeira é complexo. Considerando o fato de apenas alguns tipos apresentarem potencial oncogênico, o intervalo entre a infecção e a neoplasia ser longo, conclui-se ser a progressão viral dependente de cofatores (Crum, 2000; Castellsagué et al., 2002; Doobar, 2005).

Uma das ações fundamentais do HPV de alto risco oncogênico integrado ao genoma da célula hospedeira, na carcinogênese do colo uterino, ocorre no final da fase G1 do ciclo celular. Junto ao ponto de restrição, o gene

---

E6 destrói, via ubiquitina, a p53 que se encontra hiperexpressada pelo gene TP53. Ao mesmo tempo, o gene E7 fosforila a pRB do complexo pRB-E2F, liberando o fator de transcrição E2F permitindo, então, a passagem da célula modificada para fase S do ciclo celular (Daniels et al., 1998; Talis et al., 1998; Stvenson et al., 2000; Thorland et al., 2000; Tjalma et al., 2005).

Do que até aqui foi exposto é possível afirmar serem os adenocarcinomas do colo uterino tumores pouco conhecidos, com prognóstico mais reservado. Apresentam metástases em linfonodos em estádios iniciais e suas metástases em ovário, embora raras, são mais freqüentes, além de mais resistentes à reação imunológica do organismo hospedeiro, quando comparados à variedade espinocelular (Ishikawa et al., 1999; Nagarsheth et al., 2000; Nakanishi et al., 2000; Nakanishi et al., 2001; Lea et al., 2002; Ayahan et al., 2004; Baalbergen et al., 2004; Recoules-Arche, et al., 2004; Chao et al., 2006).

É provável que as famílias de enzimas metabolizadoras GSTM1 e GSTT1 possam ter participação no desenvolvimento do adenocarcinoma do colo uterino, agindo como cofatores na carcinogênese, além do HPV, fator causal da neoplasia cervical e dos polimorfismos da proteína p53 no códon72.

Os tumores malignos que surgem em tecidos infectados pelo HPV, podem levar de 15 a 20 anos para seu desenvolvimento. Durante esse intervalo de tempo, mulheres portadoras de infecção promovida pelo HPV, se portadoras das enzimas metabolizadoras da fase I (CYP450), com alta atividade, poderiam facilmente ativar compostos xenobióticos. Caso também fossem portadoras de enzimas da fase II (GSTM1 e GSTT1) com baixa atividade ou ausentes (GSTM1\*0 e GSTT1\*0), poderiam ter dificuldade na depuração desses compostos ativados. Desse modo, aumentariam a quantidade de metabólitos ativos com detoxificação lenta. Isto ocasionaria modificações epigenéticas na cromatina e/ou acúmulo de mutações no DNA, em suas células já infectadas pelo HPV. Este fato poderia dar continuidade ao processo da carcinogênese iniciado pelo vírus (Hines, McCarver, 2002; Mccarver, Hines, 2002; Feinberg et al,2004; Wogan et al., 2004; Ferreira et al., 2006; Joseph et al., 2006; Shimada, 2006).

---

Na literatura compulsada, poucos são os ensaios referentes à suscetibilidade do genótipo ARG da proteína nuclear p53 durante a indução da carcinogênese dos adenocarcinomas do colo do útero. Quanto as variedades polimórficas das famílias GSTM e GSTT as publicações estão voltadas à genese dos tumores espinocelulares do colo uterino.

Considerando a paucidade de informações e as contradições existentes na literatura, surge a indagação quanto à participação das variações de alelos da proteína p53 e do polimorfismo GSTM1e GSTT1 da enzima glutathiona-S-transferase na determinação de maior risco para o desenvolvimento do adenocarcinoma cervical uterino.

---



## **2. PROPOSIÇÃO**

---

O presente estudo utilizando técnicas de biologia molecular tem como objetivo avaliar:

1. A prevalência do HPV em adenocarcinomas cervicais e seu risco na carcinogênese uma vez que é considerado seu fator causal;
  2. A participação dos polimorfismos da proteína p53, no códon 72, na carcinogênese do adenocarcinoma do colo uterino, isoladamente ou associados ao HPV e determinação de possível risco;
  3. O comportamento das variantes polimórficas GSTM1, GSTM1\*0, GSTT1 e GSTT1\*0 em pacientes com adenocarcinoma cervical uterino, isoladamente ou associadas ao HPV e aquilatar o risco para desenvolvimento dessa neoplasia;
  4. As eventuais associações dos polimorfismos da p53 com as variantes polimórficas GSTM1, GSTM1\*0, GSTT1 e GSTT1\*0 no desenvolvimento do adenocarcinoma do colo do útero e determinar o risco de tais associações;
  5. As possíveis associações das variantes polimórficas GSTM1, GSTM1\*0, GSTT1 e GSTT1\*0 na carcinogênese do adenocarcinoma do colo do útero e o eventual risco dessas combinações.
-

### ***3. PACIENTES E MÉTODOS***

---

---

### **3.1 Pacientes**

O projeto foi apresentado à Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo, recebendo aprovação nº 1051/03 (Anexo1).

O grupo de estudo foi composto por 44 amostras de adenocarcinoma de colo uterino, conservados em blocos de parafina cedidos, com comprovante de cessão, pelas seguintes Instituições:

- U.E.S. de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP) (Anexo 2).
- Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP – EPM) (Anexo 3).
- Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC) (Anexo 4).
- Laboratório Centro Diagnóstico de Guarulhos (CEDIG) (Anexo 5).
- Laboratório de Patologia e Citologia (LABPAC) (Anexo 6).

O grupo controle foi constituído de 100 amostras de raspado do canal cervical uterino. Parte do material foi obtida do excedente da coleta endocervical para exame citológico de mulheres atendidas no Laboratório Médico - Serviço de Assistência Especializada (SAE) para os exames colpocitológico e colposcópico de rotina (Anexo 7). O restante foi obtido de mulheres atendidas no Centro Médico do Hospital Santa Isabel e no Ambulatório do Núcleo de Prevenção de Doença Ginecológica da Disciplina de Ginecologia Geral do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM.

As pacientes foram orientadas quanto aos objetivos da pesquisa. Assinaram termo de consentimento livre e esclarecido, que lhes garantia condução do tratamento e assistência, independente de seu consentimento ou desistência em qualquer etapa do estudo (Anexo 8).

---

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Método de seleção do grupo estudo**

O grupo de estudo foi composto por fragmentos tumorais obtidos de 44 mulheres com adenocarcinoma de colo uterino em qualquer estágio clínico, comprovado por exame anatomopatológico e ainda sem tratamento. Os fragmentos foram fixados e blocados em parafina, processados histologicamente, com diagnóstico histopatológico final de adenocarcinoma fornecido pelos laboratórios participantes (Quadro 1):

- U.E.S. de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP) – 14 casos.
- Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM) - 23 casos.
- Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC) - 5 casos.
- Laboratório Centro Diagnóstico de Guarulhos (CEDIG) – um caso.
- LABPAC (Laboratório de Patologia e Citologia) um caso.

A faixa etária das pacientes desse grupo variou de 23 a 86 anos, com média de 52,2 anos. Quanto ao tipo histopatológico, de acordo com Zaino (2000), havia 31 casos de adenocarcinoma mucinoso endocervical, 8 casos de adenocarcinoma do tipo endometrióide de origem endocervical, 3 casos de adenocarcinoma de células claras de origem endocervical e 2 casos de adenocarcinoma viloglandular.

---

**Quadro 1 – Distribuição dos casos de adenocarcinoma blocados em parafina segundo número de ordem, serviço de origem, nome, idade, número do bloco, resultado do exame anatomopatológico e variedade histológica**

Nº	Origem	Nome	Idade	Nº Bloco	Ex. Anatomo.	Variedade Histológica
T 01	FCMSCSP	YA	78	9700472	Adenocarcinoma	Endometrióide
T 02	FCMSCSP	MSR	86	9714031	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 03	FCMSCSP	JMR	81	9714684	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 04	FCMSCSP	MCC	67	9801002	Adenocarcinoma	Células Claras
T 05	FCMSCSP	HAI	66	9804364	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 06	FCMSCSP	FASP	44	9812221	Adenocarcinoma	Endometrióide
T 07	FCMSCSP	GRS	45	9816753	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 08	FCMSCSP	MAS	60	9900747	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 09	FCMSCSP	GPBC	63	9902615	Adenocarcinoma	Endometrióide
T 10	FCMSCSP	EDL	63	10006996	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 11	FCMSCSP	ERNS	50	10010325	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 12	FCMSCSP	DPR	71	10016701	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 13	FCMSCSP	MMG	49	10019491	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 14	FCMSCSP	ABB	76	10012609	Adenocarcinoma	Endometrióide
T 15	UNIFESP/EPM	MPLS	33	B03-7418	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 16	UNIFESP/EPM	LCR	23	B02-7595	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 17	UNIFESP/EPM	VPS	65	B00-34776	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 18	UNIFESP/EPM	MRO	40	B00-35765	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 19	UNIFESP/EPM	AR	29	B00-19217	Adenocarcinoma	Villoglandular
T 20	UNIFESP/EPM	MCRR	47	B99-15958	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 21	UNIFESP/EPM	MJG	40	B02-3513	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 22	UNIFESP/EPM	EAC	62	B02-5997	Adenocarcinoma	Endometrióide
T 23	UNIFESP/EPM	TSM	70	B02-8193	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 24	UNIFESP/EPM	CLA	66	B02-2500	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 25	UNIFESP/EPM	CXR	39	B02-1227	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 26	UNIFESP/EPM	DMS	39	B01-36690	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 27	UNIFESP/EPM	HMA	62	B00-7489	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 28	UNIFESP/EPM	MMM	40	B01-15880	Adenocarcinoma	Células Claras
T 29	UNIFESP/EPM	MAS	47	B02-6987	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 30	UNIFESP/EPM	NAFA	62	B03-6312	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 31	UNIFESP/EPM	MCSA	49	B00-35765	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 32	UNIFESP/EPM	CVS	67	B03-1960	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 33	UNIFESP/EPM	PLPS	40	B04-15477	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 34	UNIFESP/EPM	EPAB	50	B04-19644	Adenocarcinoma	Villoglandular
T 35	UNIFESP/EPM	MLMS	49	B04-23801	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 36	UNIFESP/EPM	MLS	30	B03-1385	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 37	UNIFESP/EPM	GG	53	B03-1885	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 38	IBCC	MVC	53	S99-0342	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 39	IBCC	LAS	41	S00-1431	Adenocarcinoma	Mucinoso Endoc.
T 40	IBCC	EBA	40	S00-3189	Adenocarcinoma	Células Claras
T 41	IBCC	IGA	33	S00-3815	Adenocarcinoma	Endometrióide
T 42	IBCC	JDM	44	S00-4552	Adenocarcinoma	Endometrióide
T 43	CEDIG	MOL	40	AS-76748	Adenocarcinoma	Endometrióide
T 44	LABPAC	MCM	45	A-840010	Adenocarcinoma	Endometrióide
Média (em anos) = 52,2						

**Legenda:**

FCMSCSP – Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; UNIFESP/EPM – Universidade Federal de São Paulo/ Escola Paulista de Medicina; IBCC – Instituto Brasileiro de Controle do Câncer  
CEDIG – Centro Diagnóstico de Guarulhos; LABPAC – Laboratório de Patologia e Colposcopia; Endoc.- endocervical

### **3.2.2 Método de seleção do grupo controle**

O grupo controle foi constituído por 100 amostras de raspado endocervical obtidas em:

- Laboratório Médico SAE 69 amostras.
- Centro Médico do Hospital Santa Isabel 7 amostras de mulheres que assinaram termo de consentimento pós-informado.
- Núcleo de Prevenção de Doença Ginecológica do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM 24 amostras de mulheres que assinaram termo de consentimento pós-informado.

A coleta foi realizada com escova apropriada para coleta endocervical, sendo feito esfregão em lâmina para exame colpocitológico e o restante do material disperso em solução de Tris EDTA, conservada em tubo Eppendorff, para posterior análise.

As mulheres incluídas nesse grupo estavam em faixa etária pareada à do grupo de estudo, variando de 25 a 81 anos, com média de 53,4. A ausência de neoplasia intra-epitelial e invasora do trato genital inferior foi comprovada por exame citológico e colposcópico (Quadro 2).

---

**Quadro 2 – Distribuições dos casos controle de mulheres sem de neoplasia cervical, segundo número de ordem, serviço de origem, número do registro, nome, idade, resultado dos exames citopatológico e colposcópico**

Nº	Origem	Nome	Idade	Cito	Colpo	Nº	Origem	Nome	Idade	Cito	Colpo
C 01	SAE	MMDG	43	ARI	ZTN-C	C 51	SAE	EAM	49	ARI	ZTN-C
C 02	SAE	AIT	34	ARI	ZTN-C	C 52	SAE	ALVD	49	ARI	ZTN-C
C 03	SAE	CR	29	SA	ZTN	C 53	SAE	NPK	63	ARI	ZTN-C
C 04	SAE	NSS	31	ARI	C D	C 54	SAE	ISG	36	ARI	ZTN-C
C 05	SAE	CMC	36	ARI	ZTN-C	C 55	SAE	MZ	67	EA	C
C 06	SAE	SAS	36	ARI	ZTN-C	C 56	SAE	TRMT	51	ARI	ZTN-C
C 07	SAE	CBT	44	ARI	ZTN-C	C 57	SAE	RWT	32	ARI	ZTN-C
C 08	SAE	MAP	31	ARI	ZTN-C	C 58	SAE	MAM	27	ARI	ZTN-C
C 09	SAE	NPG	39	ARI	ZTN-C	C 59	SAE	RCBV	25	ARI	ZTN-C
C 10	SAE	EBGO	77	EA	EI	C 60	SAE	CS	34	ARI	ZTN-C
C 11	SAE	SLO	63	EA	EI	C 61	SAE	MSV	46	ARI	ZTN-C
C 12	SAE	VQS	57	ARI	EI	C 62	SAE	FYS	30	ARI	ZTN-C
C 13	SAE	SRC	51	ARI	ZTN-C	C 63	SAE	BS	51	ARI	ZTN-C
C 14	SAE	SMSS	26	ARI	ZTN-C	C 64	SAE	CRC	30	ARI	ZTN-C
C 15	SAE	MCRM	42	ARI	ZTN-C	C 65	SAE	ASS	37	ARI	ZTN-C
C 16	SAE	NTY	70	EA	C	C 66	SAE	DB	50	ARI	ZTN-C
C 17	SAE	MGO	42	ARI	ZTN-C	C 67	SAE	GCL	44	ARI	ZTN-C
C 18	SAE	MNSA	33	ARI	ZTN-C	C 68	SAE	JBS	39	ARI	ZTN-C
C 19	SAE	IVBT	76	EA	ZTN-C	C 69	SAE	MGC	28	ARI	ZTN-C
C 20	SAE	APA	35	ARI	ZTN-C	C 70	HSI	BN	68	EA	C
C 21	SAE	EO	52	ARI	ZTN-C	C 71	HSI	TB	34	SA	ZTN
C 22	SAE	ALM	31	ARI	ZTN-C	C 72	HSI	RC	45	ARI	ZTN-C
C 23	SAE	MSML	29	ARI	ZTN-C	C 73	HSI	TAG	37	SA	ZTN
C 24	SAE	RLMR	46	ARI	ZTN-C	C 74	HSI	APPS	27	ARI	ZTN-C
C 25	SAE	MASL	51	ARI	ZTN-C	C 75	HSI	NMG	52	ARI	ZTN-C
C 26	SAE	ACMS	29	ARI	ZTN-C	C 76	HSI	EFS	45	ARI	ZTN-C
C 27	SAE	TGF	35	ARI	ZTN-C	C 77	EPM	MCQ	80	EA	C
C 28	SAE	JM	29	ARI	ZTN-C	C 78	EPM	ARG	74	EA	C
C 29	SAE	CCPF	54	ARI	ZTN-C	C 79	EPM	MLAM	80	EA	C
C 30	SAE	SRTB	28	ARI	ZTN-C	C 80	EPM	ERB	47	ARI	ZTN-C
C 31	SAE	MJMS	53	ARI	ZTN-C	C 81	EPM	MOG	70	EA	C
C 32	SAE	CNS	26	ARI	ZTN-C	C 82	EPM	ELM	47	ARI	ZTN-C
C 33	SAE	GPAM	56	EA	EI	C 83	EPM	SMM	44	ARI	ZTN-C
C 34	SAE	VF	37	ARI	ZTN-C	C 84	EPM	CRR	68	ARI	ZTN-C
C 35	SAE	VML	29	ARI	ZTN-C	C 85	EPM	EAS	75	EA	C
C 36	SAE	EB	68	EA	C	C 86	EPM	ASC	81	EA	C
C 37	SAE	SLFS	37	ARI	ZTN-C	C 87	EPM	LSS	31	ARI	ZTN-C
C 38	SAE	MCES	61	EA	C	C 88	EPM	MCR	48	ARI	ZTN-C
C 39	SAE	RCBA	63	EA	C	C 89	EPM	ES	37	ARI	ZTN-C
C 40	SAE	EA	70	EA	C	C 90	EPM	MSS	51	ARI	ZTN-C
C 41	SAE	FFP	25	ARI	ZTN-C	C 91	EPM	MRN	35	ARI	ZTN-C
C 42	SAE	OMZR	67	EA	EI	C 92	EPM	CSR	38	ARI	ZTN-C
C 43	SAE	TTNJ	76	EA	CA	C 93	EPM	SEM	39	ARI	ZTN-C
C 44	SAE	TMS	38	ARI	ZTN-C	C 94	EPM	DJM	41	ARI	ZTN-C
C 45	SAE	MSF	39	SA	Pólipo	C 95	EPM	MAR	43	ARI	ZTN-C
C 46	SAE	TLMC	55	EA	C	C 96	EPM	JPM	54	ARI	ZTN-C
C 47	SAE	MAM	29	ARI	ZTN-C	C 97	EPM	AR	36	ARI	ZTN-C
C 48	SAE	SDFS	46	SA	EI	C 98	EPM	MLMSL	57	ARI	ZTN-C
C 49	SAE	MAB	59	ARI	ZTN-C	C 99	EPM	VES	37	ARI	ZTN-C
C 50	SAE	ALC	30	ARI	ZTN-C	C 100	EPM	EY	41	ARI	ZTN-C

Média (em anos) = 53,4

**Legenda:**

SAE – Serviço de Análise Especializada; HSI – Centro Médico do Hospital Santa Isabel; EPM – Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina; Cito - Citologia; Colpo - Colposcopia; ARI - Alterações Reativas e Inflamatórias; C- Colpite Atrófica; CD- Colpite difusa; EA- Epitélio Atrófico; E I – Exame Insatisfatório; SA - Sem Alterações; ZTN- Zona de Transformação Normal; ZTN-C Zona de Transformação Normal e Colpite.



### **3.2.3 Método Histopatológico**

Os fragmentos de adenocarcinoma, do grupo estudo, foram retirados das biópsias de colo uterino para diagnóstico da neoplasia ou procedente das peças anatômicas resultantes do tratamento cirúrgico, quando esse foi a primeira medida diagnóstica, em mulheres portadoras desse tipo de câncer.

O material foi processado de acordo com o padrão do laboratório de anatomia patológica de cada Instituição cedente do material. De cada caso, foi confeccionada lâmina para confirmação diagnóstica e padronização por patologista do Departamento de Patologia da UNIFESP-EPM, e dois cortes com espessura entre 6 e 8 micrometros armazenados em um tubo Eppendorff. Os tubos foram encaminhados para o Laboratório de Ginecologia Molecular do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM.

### **3.2.4 Método Citológico**

Os espécimes celulares coletados do canal cervical, do grupo controle, foram armazenados em tubos Eppendorf contendo Tris EDTA e encaminhados para o Laboratório de Ginecologia Molecular do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM. Também foi coletado material da ecto e endocérvix, feito esfregaço em lâmina de vidro que foi corado pela técnica de Papanicolaou, para verificar ausência de atipia celular que caracterizasse neoplasia intra-epitelial ou doença invasora.

### **3.2.5 Métodos Biomoleculares**

As análises biomoleculares foram realizadas no Laboratório de Ginecologia Molecular do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM. As amostras dos grupos de estudo, armazenadas em tubos de Eppendorf, foram inicialmente submetidos à:

#### **Desparafinização**

A desparafinização dos cortes histopatológicos obedeceu aos seguintes passos técnicos de acordo com Cawkwell, Quirke (2000). A cada tubo Eppendorf contendo os cortes histológicos a serem analisados, adicionou-se 1mL de xilol. Procedeu-se a homogeneização por movimentos de inversão durante 15 minutos. A seguir, realizou-se a centrifugação das alíquotas a 12.000 rpm,

---

durante 2 minutos a 20°C. Desprezou-se o sobrenadante e ao restante, adicionou-se 1mL de etanol absoluto. Executou-se nova homogeneização e centrifugação. Desprezou-se novamente o sobrenadante. Repetiram-se os passos descritos por duas vezes. Lavou-se o precipitado com etanol absoluto, para que todo o xilol fosse removido. A seguir, centrifugou-se a 12.000 rpm, durante 2 minutos a 20°C. Secou-se o precipitado em estufa durante 10 minutos.

O material do grupo estudo desparafinado juntamente com as amostras do grupo controle, foram submetidas aos seguintes procedimentos biomoleculares:

**Extração do DNA** – De acordo com as especificações de Morgan et al. (1996), adicionou-se 200µL de tampão de digestão e 5µL de proteinase K. Realizou-se a incubação do produto a 37°C por 30 minutos. Ao término desse período adicionou-se 200µL de fenol e de clorofórmio. Agitou-se em vortex até a mistura tornar-se leitosa. A seguir, centrifugou-se a 14.000 rpm, durante 10 minutos. Procedeu-se a transferência de 200µL do sobrenadante para tubo limpo e adicionou-se 900µL de etanol absoluto e 20µl de acetato de sódio. Conservou-se essa mistura a -20°C por período que variou de 48 a 72 horas para precipitação do DNA. Após esse período, centrifugou-se a mistura a 14.000 rpm, durante 15 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ao sedimento de DNA formado, adicionou-se 1mL de etanol a 80% para lavá-lo. Centrifugou-se a 14.00 rpm, durante 1 minuto. Desprezou-se o sobrenadante. Secou-se o sedimento de DNA em estufa a 70°C durante 10 minutos. Armazenou-se esse DNA a -20°C após adição de 30 µL de água milli-Q autoclavada.

**Pesquisa da presença do HPV** – Para avaliação da presença do HPV no DNA dos cortes do grupo estudo e das células endocervicais do grupo controle utilizou-se a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) de acordo com as especificações de Manos et al. (1989) e Soultzis et al. (2002).

Foram retirados 100 nanogramas de cada amostra do DNA extraído, dos grupos estudo e controle. A cada uma delas foram adicionados 1,6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 200nM de cada um das seqüências flanqueadoras, 0,024 U/ µL de Taq polimerase e solução tampão (20 mM Tris-

---

HCl pH 8,4 e 50 mM KCl) para volume total de 25  $\mu$ L além dos *primers* de consenso MY9, MY11:

MY9-MY-9CGTCCMARRGGAWACTGATC;

MY11-GCMCAGGGWCATAAYAATGG;

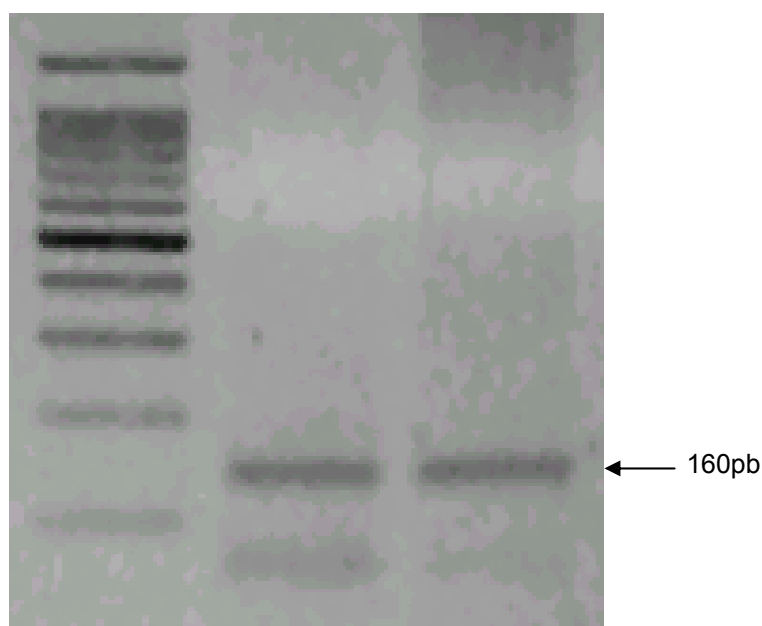
Do produto obtido foram também retirados 100 nanogramas de cada amostra e repetido o mesmo esquema utilizado inicialmente, agora com os *primers* GP5 e GP6:

GP5+–5` TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC 3`;

GP6+– 5` GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C 3`.

A seqüência das reações constaram de desnaturação a 94° C por 5 min, seguida por 45 ciclos em temperaturas de 94°C por 1 minuto, acompanhada por temperatura de anelamento a 55°C com 1 min de duração, extensão a 72°C por 1 min e no final, extensão a 72° C por 5 min. O produto apresentou 450pb para os *primers* MY9 e MY11 e 160 pb para os *primers* GP5 e GP6.

Para a observação dos resultados utilizou-se gel de agarose 2% com brometo de etídio (Figura 1).



**Figura 1** - Gel de agarose demonstrando presença de HPV em 160pb utilizando-se os *primers* GP5 e GP6 em amostra de adenocarcinoma cervical.

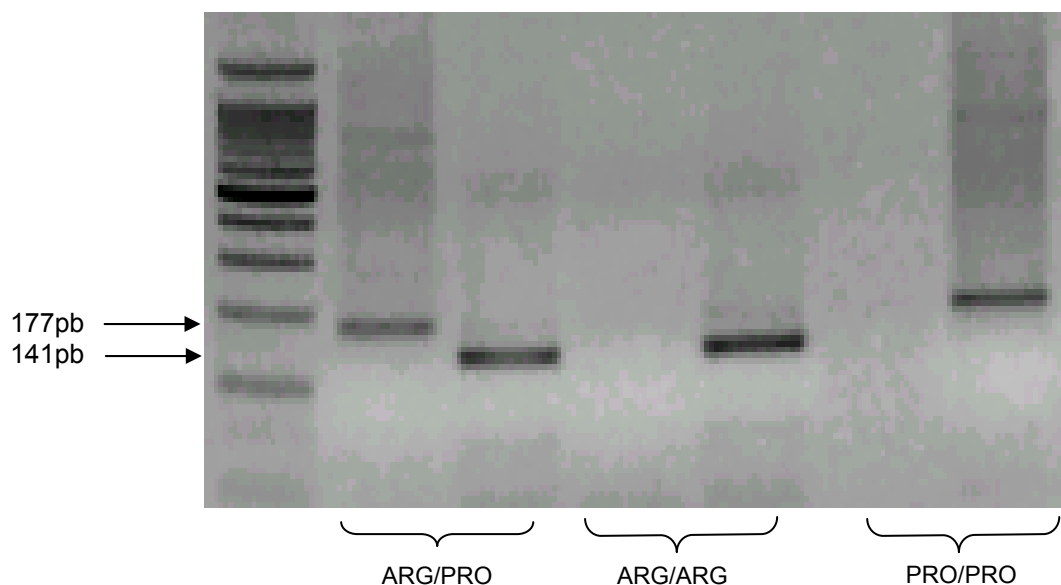
### Amplificação das seqüências polimórficas do gene TP53

O polimorfismo no códon 72 do gene TP53 foi analisado no DNA dos grupos controle e estudo de acordo com Soultziz et al. (2002), utilizando a técnica PCR.

Aos 100 nanogramas de DNA de cada amostra foram adicionados 1,6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP e 200nM de cada um das seqüências flanqueadoras para o alelo arginina: “sense” TCC CCC TTG CCG TCC CAA e “antisense” CTG GTG CAG GGG CCA CGC, além de 0,024 U/ µL de Taq polimerase e solução tampão (20 mM Tris- HCl pH 8,4 e 50 mM KCl) para volume total de 25 µL.

Para a amplificação do alelo prolina utilizaram-se os seguintes *primers*: “sense” GCC AGA GGC TGC TCC CCC e “antisense” CGT GCA AGT CAC AGA CTT, tendo sido feita separadamente obedecendo aos mesmos critérios. As amplificações seguiram as especificações: desnaturação inicial a 94° C durante 3 minutos, amplificação por 35 ciclos, a 94° C durante 30 segundos, 60° C para o alelo ARG e 54° C para o alelo PRO por 30 segundos e 72° C por 30 segundos, seguidos por período de alongação a 72° C durante cinco minutos.

O produto apresentou 141 pares de base para o alelo p53 ARG e 177 pb para o alelo p53 PRO (Figura 2).

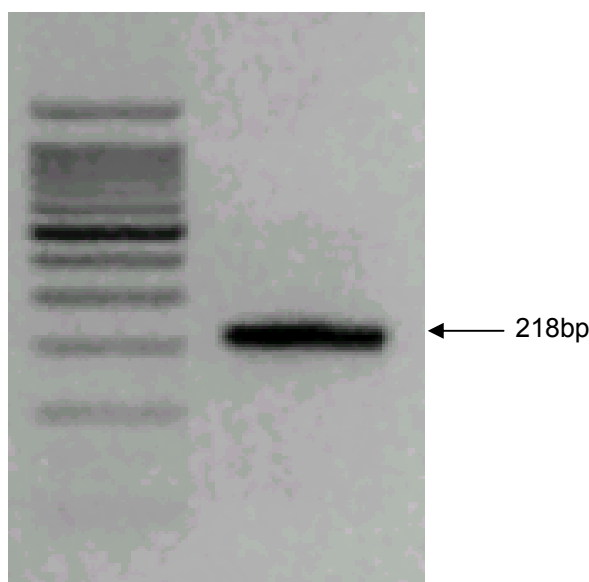


**Figura 2** - Gel de agarose demonstrando presença das três isoformas da p53 em 177 pb e 141pb.

### Pesquisa dos alelos da família GSTM1

A demonstração da presença ou ausência de GSTM1 foi realizada a partir do DNA dos grupos controle e estudo de acordo com as especificações de Ueda et al. (2005), pela técnica de PCR.

Aos 100 nanogramas de DNA de cada amostra foram adicionados 1,6 mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu M$  de cada dNTP, 0,024 U/  $\mu L$  de Taq polimerase, 200nM das seqüências flanqueadoras GSTM1 (Forward) - 5'- GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3' e GSTM1 (Reverse)- 5'- GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3'; e solução tampão (20 mM Tris- HCl pH 8,4 e 50 mM KCl) de modo que o volume total alcance o valor de 25  $\mu L$ . A seqüência da reação constou de: desnaturação à temperatura de 94°C por cinco minutos, acompanhada por 43 ciclos com temperaturas de 94°C por um minuto, temperatura de anelamento de 55° C por um minuto e extensão de 72° C por um minuto e no final cinco minutos de extensão a 72°C. O produto apresentou 218 pares de base (Figura 3).



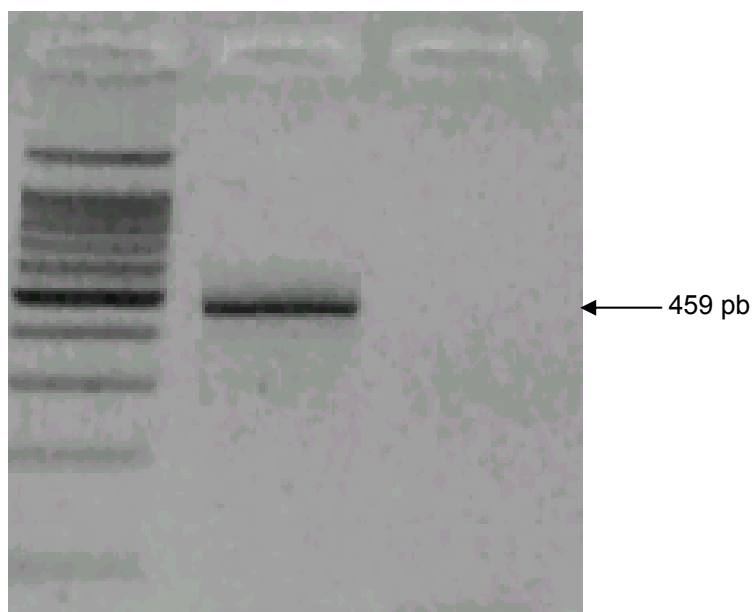
**Figura 3** - Gel de agarose demonstrando presença da isoforma da GSTM1 em 218 pb.

### Pesquisa dos alelos da família GSTT1

A contatação da presença ou ausência de GSTT1 foi feita a partir do DNA dos grupos de estudo e controle pela técnica PCR de acordo com Ueda et al. (2005).

Aos 100 nanogramas de DNA de cada amostra foram adicionados 1,6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,024 U/ µL de Taq polimerase (de acordo com EPPENDORF), 200nM das seqüências flanqueadoras: GSTT1 (Forward) - 5'- TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC -3' e GSTT1 (Reverse) - 5'- TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'

A seqüência da reação constou de: 94°C de desnaturação por 9 min, 43 ciclos com temperaturas de 94°C por um minuto, temperatura de anelamento de 58°C por um minuto, extensão de 72° C por um minuto e no final 10 minutos de extensão a 72°C. O produto apresentou 459 pares de base (Figura 4).



**Figura 4** - Gel de agarose demonstrando presença da GSTT1 em 459 pb.

### **3.2.6 Método Estatístico**

A análise estatística foi realizada utilizando os seguintes testes:

Teste t de Student, para comparar as idades entre os grupos (Callegari-Jacques, 2004a);

Qui-quadrado, para comparar a presença do HPV nos grupos estudo e controle para verificar a participação das variedades polimórficas das famílias GSTM1 e GSTT1 nos dois grupos (Callegari-Jacques, 2004b);

Teste exato de Fisher, para análise das isoformas da proteína p53 nos grupos de estudo e controle; análise da associação do HPV com isoformas da proteína p53 e com os alelos das enzimas GSTM1 e GSTT1 na gênese do adenocarcinoma do colo uterino, assim como a análise da associação das isoformas da p53 com os alelos das famílias GSTM1 e GSTT1 (Callegari-Jacques, 2004c);

Análise de estimativa de probabilidade máxima, para avaliar a associação das famílias das enzimas GSTM1 e T1 na carcinogênese do colo uterino.

Em todos os testes realizados e aplicáveis o nível de rejeição da hipótese de nulidade foi  $\leq 5\%$  (0,05), sendo os resultados estatisticamente significantes assinalados com asterisco (\*).

---

## ***4. RESULTADOS***

---

---



Dos 44 espécimes selecionados para o grupo estudo foi excluído o caso nº T18 por não apresentar amplificação do DNA, restando assim 43 amostras distribuídas em 30 de adenocarcinoma mucinoso endocervical, oito de adenocarcinoma do tipo endometrióide de origem endocervical, três de adenocarcinoma de células claras de origem endocervical e duas de adenocarcinoma viloglandular (Quadro 3).

No grupo controle, composto por 100 amostras de células da endocérvix de mulheres sem neoplasia cervical, comprovou-se a não amplificação do DNA dos casos com número de ordem C14, C26, C28, C30, C32, C35, C47, C58, C59, C65, C68, C69, C74 e C77. Assim, o grupo controle ficou constituído por 86 amostras do DNA de células endocervicais (Quadro 4).

---

**Quadro 3** – Distribuição dos casos Estudo segundo identificação, idade, presença de HPV e variantes dos polimorfismos de p53, GSTM1 e GSTT1

Nº	Nome	Idade	HPV	p53	GST M1	GSTT1
T 01	YA	78	Pres	ARG/ARG	M1	T0
T 02	MSR	86	Pres	ARG/ARG	M0	T0
T 03	JMR	81	Pres	ARG/PRO	M1	T1
T 04	MCC	67	Pres	ARG/PRO	M1	N
T 05	HAI	66	Aus	ARG/PRO	M1	T1
T 06	FASP	44	Pres	ARG/PRO	M0	T0
T 07	GRS	45	Pres	ARG/PRO	M0	T1
T 08	MAS	60	Pres	ARG/ARG	M0	T0
T 09	GPBC	63	Pres	ARG/ARG	M0	T0
T 10	EDL	63	Pres	ARG/PRO	M0	T0
T 11	ERNS	50	Pres	ARG/ARG	M1	T0
T 12	DPR	71	Pres	ARG/ARG	M1	T0
T 13	MMG	49	Pres	ARG/PRO	M0	T1
T 14	ABB	76	Pres	ARG/ARG	M1	T0
T 15	MPLS	33	Pres	ARG/PRO	M0	T0
T 16	LCR	23	Pres	ARG/PRO	M0	T1
T 17	VPS	65	Pres	ARG/ARG	M1	T0
T 18	****	****	****	****	****	****
T 19	AR	29	Pres	ARG/ARG	M0	T0
T 20	MCRR	47	Pres	ARG/ARG	M0	T0
T 21	MJG	40	Pres	ARG/ARG	M0	T0
T 22	EAC	62	Pres	ARG/ARG	M1	T0
T 23	TSM	70	Pres	ARG/PRO	M0	T1
T 24	CLA	66	Pres	ARG/PRO	M0	T1
T 25	CXR	39	Pres	ARG/ARG	M0	T1
T 26	DMS	39	Pres	ARG/ARG	M0	T1
T 27	HMA	62	Pres	ARG/ARG	M1	T1
T 28	MMM	40	Pres	PRO/PRO	M0	T0
T 29	MAS	47	Pres	ARG/ARG	M0	T1
T 30	NAFA	62	Pres	ARG/ARG	M0	T1
T 31	MCSA	49	Pres	ARG/PRO	M0	T1
T 32	CVS	67	Pres	ARG/PRO	M0	T1
T 33	PLPS	40	Pres	ARG/ARG	M0	T1
T 34	EPAB	50	Pres	ARG/PRO	M0	T0
T 35	MLMS	49	Pres	ARG/ARG	M0	T1
T 36	MLS	30	Pres	ARG/ARG	M0	T0
T 37	GG	53	Pres	ARG/ARG	M0	T1
T 38	MVC	53	Pres	ARG/PRO	M0	T0
T 39	LAS	41	Pres	ARG/ARG	M1	T1
T 40	EBA	40	Pres	ARG/ARG	M1	T0
T 41	IGA	33	Pres	ARG/PRO	M1	T1
T 42	JDM	44	Pres	ARG/PRO	M1	T1
T 43	MOL	40	Pres	ARG/PRO	M1	T1
T 44	MCM	45	Pres	ARG/ARG	M1	T1
Média em anos = 52,5						

**Legenda**

\*\*\*\*\* Caso Excluído; Aus – ausente; Pres – presente; M1 – GSTM1;  
M0 – GSTM1\*0; T1 – GSTT1; T0 – GSTT1\*0

**Quadro 4** – Distribuição dos casos Controle segundo identificação, idade, presença de HPV e variantes dos polimorfismos de p53, GSTM1 e GSTT1

Nº	Nome	Idade	HPV	p53	GSTM1	GSTT1	Nº	Nome	Idade	HPV	p53	GSTM1	GSTT1
C 01	MMDG	43	Aus	ARG/PRO	MO	T1	C 51	EAM	49	Aus	ARG/PRO	MO	T1
C 02	AIT	34	Aus	ARG/ARG	MO	TO	C 52	ALVD	49	Aus	ARG/PRO	M1	T1
C 03	CR	29	Aus	ARG/ARG	MO	TO	C 53	NPK	63	Aus	ARG/ARG	M1	T1
C 04	NSS	31	Aus	PRO/PRO	MO	T1	C 54	ISG	36	Aus	ARG/ARG	MO	T1
C 05	CMC	36	Aus	ARG/ARG	MO	T1	C 55	MZ	67	Aus	ARG/PRO	MO	T1
C 06	SAS	36	Aus	PRO/PRO	M1	T1	C 56	TRMT	51	Aus	ARG/ARG	MO	TO
C 07	CBT	44	Aus	ARG/ARG	M1	TO	C 57	RWT	32	Pres	ARG/ARG	M0	T1
C 08	MAP	31	Pres	ARG/PRO	M1	T1	C 58	MAM	****	****	****	****	****
C 09	NPG	39	Aus	ARG/PRO	MO	T1	C 59	RCBV	****	****	****	****	****
C 10	EBGO	77	Aus	ARG/PRO	MO	T1	C 60	CS	34	Aus	ARG/PRO	M1	T1
C 11	SLO	63	Aus	ARG/PRO	MO	TO	C 61	MSV	46	Pres	ARG/PRO	M1	T1
C 12	VQS	57	Aus	ARG/PRO	MO	T1	C 62	FYS	30	Pres	ARG/PRO	M1	T1
C 13	SRC	51	Aus	ARG/ARG	MO	T1	C 63	BS	51	Pres	ARG/ARG	M1	T1
C 14	SMSS	****	****	****	****	****	C 64	CRC	30	Pres	ARG/ARG	M0	T0
C 15	MCRM	42	Aus	ARG/PRO	MO	T1	C 65	ASS	****	****	****	****	****
C 16	NTY	70	Aus	ARG/ARG	M1	T1	C 66	DB	50	Pres	ARG/PRO	M1	T1
C 17	MGO	42	Aus	ARG/PRO	MO	T1	C 67	GCL	44	Pres	ARG/PRO	M1	T1
C 18	MNSA	33	Pres	ARG/PRO	M0	T1	C 68	JBS	****	****	****	****	****
C 19	IVBT	76	Aus	ARG/ARG	M1	T1	C 69	MGC	****	****	****	****	****
C 20	APA	35	Aus	ARG/ARG	MO	TO	C 70	BN	68	Pres	ARG/PRO	M1	T1
C 21	EO	52	Aus	ARG/PRO	MO	T1	C 71	TB	34	Pres	ARG/ARG	M1	T1
C 22	ALM	31	Pres	ARG/PRO	M0	T1	C 72	RC	45	Pres	ARG/PRO	M1	T1
C 23	MSML	29	Pres	ARG/PRO	M0	T1	C 73	TAG	37	Pres	PRO/PRO	M1	T1
C 24	RLMR	46	Aus	ARG/PRO	M1	T1	C 74	APPS	****	****	****	****	****
C 25	MASL	51	Aus	ARG/PRO	MO	T1	C 75	NMG	52	Pres	ARG/PRO	M1	T1
C 26	ACMS	****	****	****	****	****	C 76	EFS	45	Pres	ARG/ARG	M1	T1
C 27	TGF	35	Pres	ARG/PRO	M0	T1	C 77	MCQ	****	****	****	****	****
C 28	JM	****	****	****	****	****	C 78	ARG	74	Aus	ARG/PRO	M0	T1
C 29	CCPF	54	Pres	ARG/PRO	M0	T1	C 79	MLAM	80	Aus	ARG/ARG	M1	TO
C 30	SRTB	****	****	****	****	****	C 80	ERB	47	Pres	ARG/ARG	M1	T0
C 31	MJMS	53	Aus	ARG/PRO	MO	TO	C 81	MOG	70	Aus	ARG/ARG	M1	T1
C 32	CNS	****	****	****	****	****	C 82	ELM	47	Aus	ARG/PRO	M1	T1
C 33	GPAM	56	Aus	ARG/PRO	M1	T1	C 83	SMM	44	Aus	ARG/ARG	M1	T1
C 34	VF	37	Aus	ARG/ARG	M1	T1	C 84	CRR	68	Aus	ARG/PRO	MO	T1
C 35	VML	****	****	****	****	****	C 85	EAS	75	Aus	ARG/PRO	M1	TO
C 36	EB	68	Aus	ARG/PRO	M1	T1	C 86	ASC	81	Aus	ARG/ARG	M1	T1
C 37	SLFS	37	Pres	ARG/ARG	M0	T0	C 87	LSS	31	Aus	ARG/PRO	MO	T1
C 38	MCES	61	Aus	ARG/PRO	M1	T1	C 88	MCR	48	Pres	ARG/PRO	M0	T1
C 39	RCBA	63	Aus	ARG/ARG	MO	T1	C 89	ES	37	Aus	ARG/ARG	MO	T1
C 40	EA	70	Aus	ARG/ARG	M1	TO	C 90	MSS	51	Pres	ARG/PRO	M1	T1
C 41	FFP	25	Aus	ARG/PRO	MO	TO	C 91	MRN	35	Pres	ARG/ARG	M0	T1
C 42	OMZR	67	Aus	ARG/ARG	MO	T1	C 92	CSR	38	Pres	ARG/ARG	M0	T1
C 43	TTNJ	76	Aus	ARG/ARG	M1	T1	C 93	SEM	39	Aus	ARG/PRO	MO	T1
C 44	TMS	38	Aus	ARG/PRO	MO	T1	C 94	DJM	41	Pres	ARG/ARG	M0	T1
C 45	MSF	39	Aus	ARG/PRO	M1	T1	C 95	MAR	43	Pres	ARG/ARG	M0	T1
C 46	TLMC	55	Aus	ARG/PRO	M1	T1	C 96	JPM	54	Aus	ARG/PRO	MO	T1
C 47	MAM	****	****	****	****	****	C 97	AR	36	Aus	ARG/PRO	MO	T1
C 48	SDFS	46	Aus	ARG/ARG	MO	T1	C 98	MLMSL	57	Aus	ARG/ARG	MO	T1
C 49	MAB	59	Aus	ARG/ARG	MO	TO	C 99	VES	37	Aus	ARG/ARG	M1	TO
C 50	ALC	30	Aus	ARG/ARG	MO	T1	C 100	EY	41	Aus	ARG/PRO	MO	T1

Média em anos = 48,06

Legenda\*\*\*\* - caso excluído; Aus – ausente; Pres – presente; M1 – GSTM1; M0 – GSTM1\*0; T1 – GSTT1; T0 – GSTT1\*0

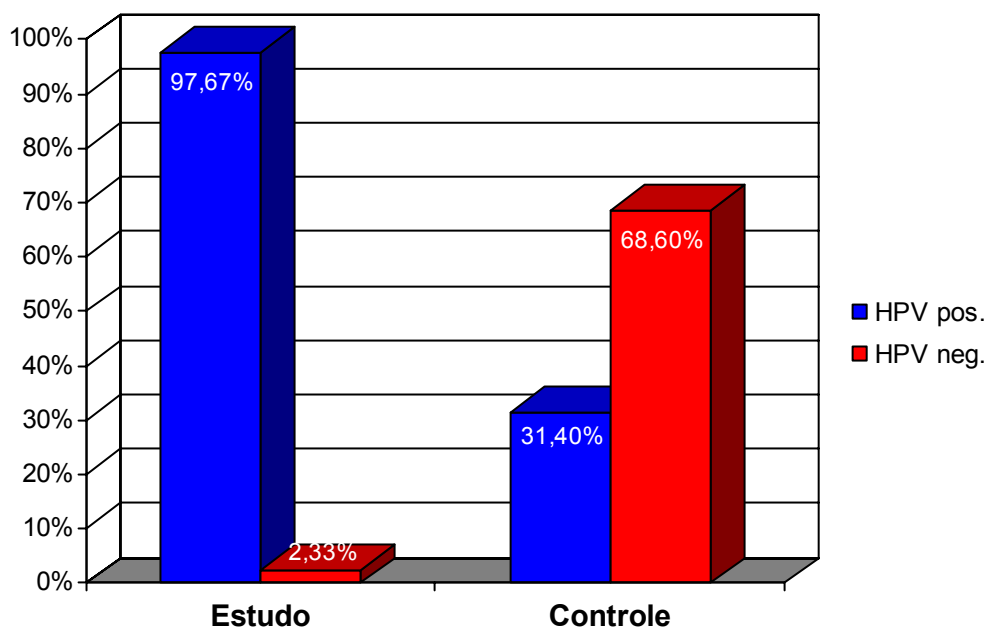
#### 4.1 Faixa Etária

A faixa etária do grupo estudo variou de 23 a 86 anos, com média de 52,48 e mediana de 49 anos. Já no grupo controle, variou de 25 a 81 anos, com média de 48,06 e mediana de 45 anos.

A análise dos grupos revelou serem os mesmos homogêneos pelo teste t de Student  $p=0,1042$  (IC 95%).

#### 4.2 Presença do HPV

A reação em cadeia da polimerase, realizada em ambos os grupos, revelou a presença de HPV em 42 casos do grupo estudo (97,67%), em 27 (31,40%) casos controles (Figura 5).



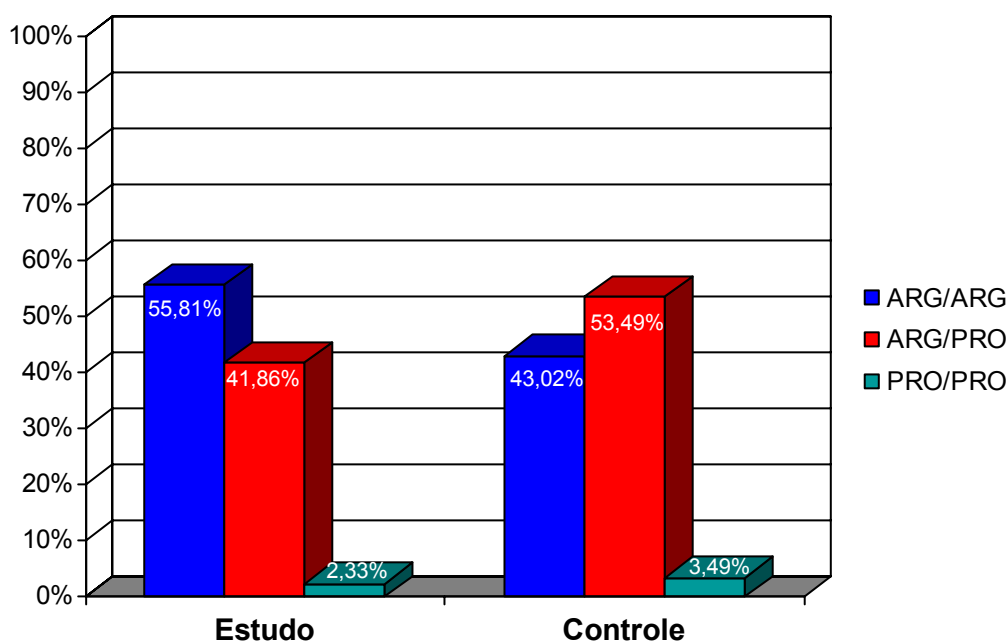
**Figura 5** – Distribuição da presença do DNA-HPV nos grupos estudo e controle. Teste  $\chi^2$ :  $p=0,001$ (IC95%)\*

A análise estatística, utilizando o teste de Qui-quadrado ( $p=0,001$ ), demonstrou diferença significativa entre os dois grupos.

A análise de estimativa de máxima probabilidade, de razão de chances com intervalo de confiança de 95%, mostrou razão de chances 113,79 vezes (IC de 95%: 13,671; 947,145) ( $p<0,001$ ) para a presença do HPV\*.

### 4.3 Polimorfismo da p53

A avaliação do polimorfismo da proteína p53 no códon 72 revelou no grupo estudo, as isoformas: ARG/ARG em 24 casos (55,81%); ARG/PRO 18 casos (41,86%) e PRO/PRO 1 caso (2,33%). No grupo controle estas isoformas estiveram assim distribuídas: ARG/ARG 37 (43,02%), ARG/PRO 46 (53,49%) e PRO/PRO 3 (3,49%) amostras (Figura 6).

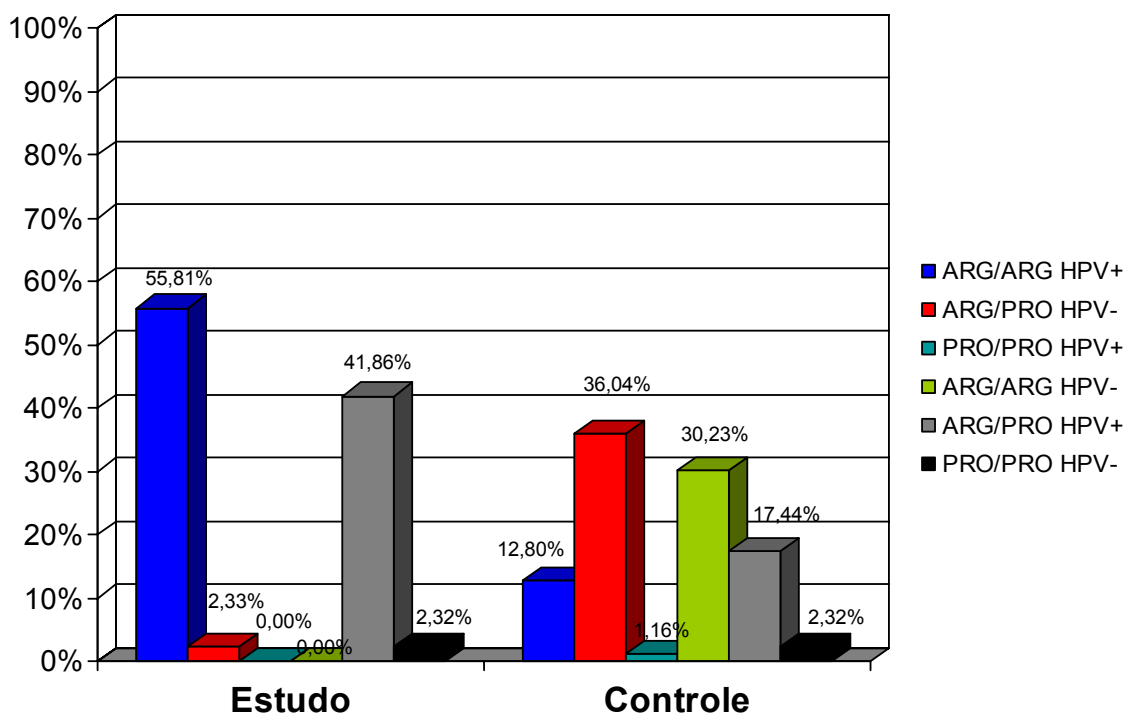


**Figura 6** – Distribuição das isoformas da proteína p53 nos grupos estudo e controle. Teste exato de Fisher:  $p=0,397$  (IC de 95%)

#### 4.4 Associação da presença viral e polimorfismo da p53

Buscando a associação entre presença viral e as diferentes isoformas da p53 detectou-se, no grupo estudo, 24 casos (55,81%) com isoforma ARG/ARG; 18 (41,86%) na forma ARG/PRO e um único caso (2,33%) para PRO/PRO. O caso restante, HPV negativo, mostrou isoforma ARG/PRO.

Do mesmo modo, no grupo controles ocorreram 11 (12,80%) casos HPV positivos, com a p53 representada pelo alelo ARG/ARG e 15 (17,44%) casos HPV positivos, com a p53 na isoforma ARG/PRO; 1 (1,16%) caso HPV positivo com a p53 PRO/PRO. Nos casos em que não foi detectada a presença viral, a distribuição da isoforma foi 26(30,23%) casos ARG/ARG; 31(36,04%) casos ARG/PRO e 2 (2,32%) de casos PRO/PRO (Figura 7).

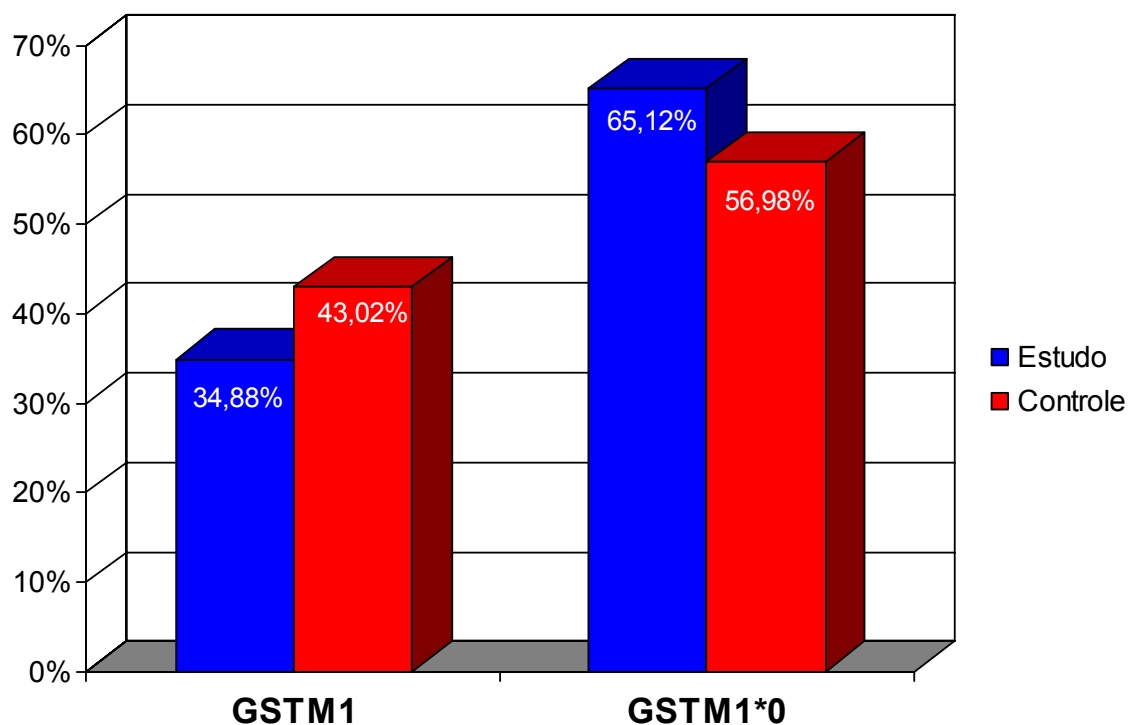


**Figura 7** – Distribuição da associação da presença viral HPV com isoformas da proteína p53 no códon 72. Teste exato de Fisher:  $p=0,653$  (IC de 95%)

#### 4.5 Polimorfismo da família GSTM1

O estudo do polimorfismo da enzima GSTM1 com os alelos GSTM1 e GSTM1\*0 mostrou, no grupo estudo, a presença de GSTM1 em 15 casos (34,88%). O alelo nulo (GSTM1\*0) ocorreu em 28 casos (65,12%).

No grupo controle, a GSTM1 estava presente em 37 casos (43,02%) e o alelo nulo (GSTM1\*0) em 49 casos (56,98%) (Figura 8).

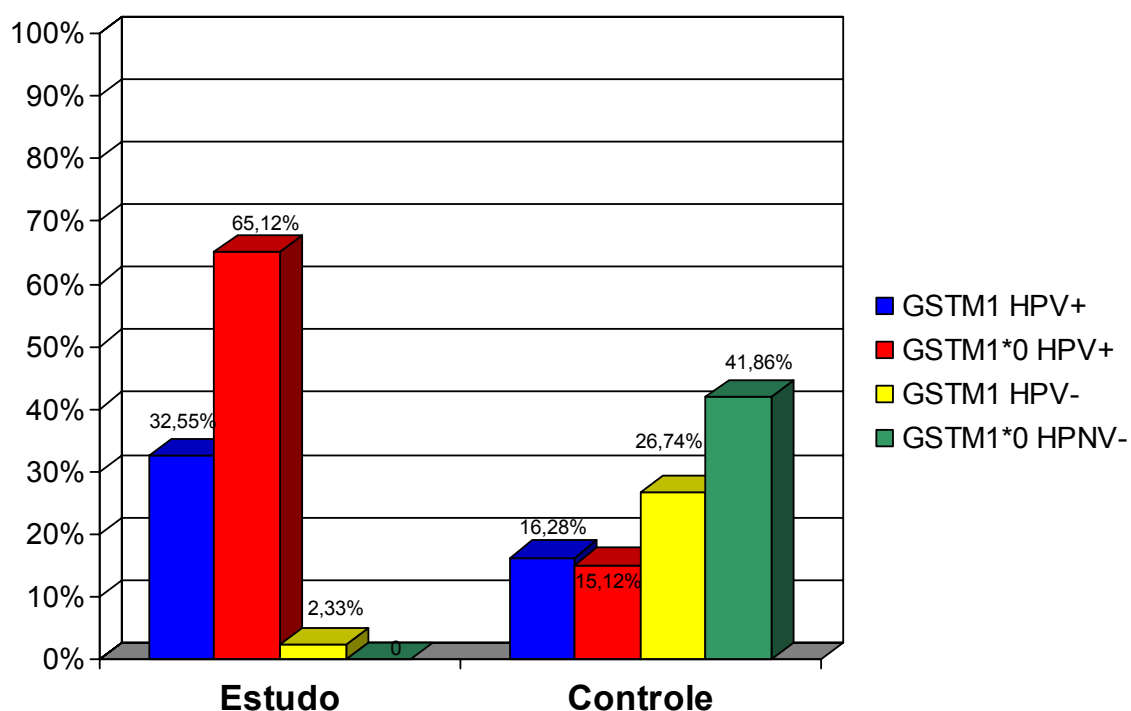


**Figura 8** – Distribuição dos alelos GSTM1 e GSTM1\*0 nos grupos estudo e controle. Teste  $\chi^2$ :  $p=0,374$  (IC de 95%).

#### 4.6 Associação da presença viral com a família de enzimas GSTM1

A presença de HPV associado à enzima GSTM1 foi verificada em 14 (32,55%) casos GSTM1 e 28 (65,12%) casos GSTM1\*0 do grupo estudo. O caso restante, HPV negativo, continha GSTM1.

Já no grupo controle, 14 (16,28%) casos eram GSTM1 e 13 (15,12%) casos GSTM1\*0 dentre aqueles com presença viral evidenciada. Entre os casos negativos para o HPV, havia 23 (26,74%) casos GSTM1 e 36 (41,86%) casos GSTM1\*0 (Figura 9).



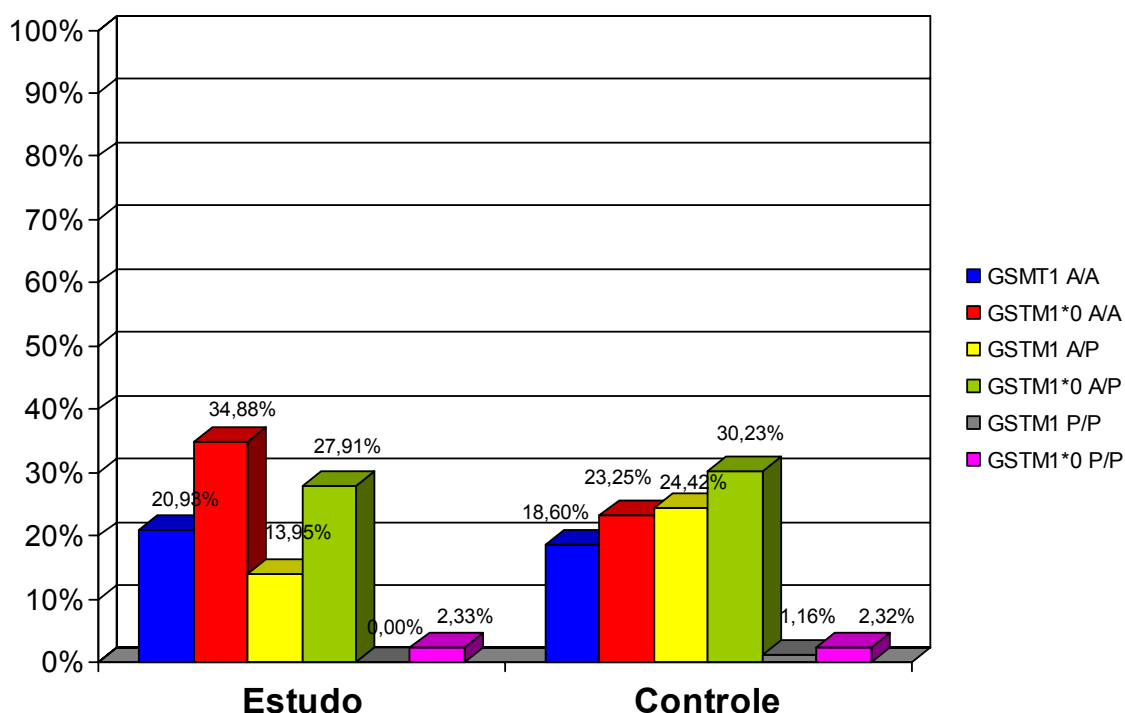
**Figura 9** – Distribuição da associação da presença viral com alelos da família GSTM1 nos grupos estudo e controle. Teste exato de Fisher  $p=0,256$  (IC de 95%).



#### 4.7 Associação do polimorfismo da p53 e família GSTM1

A associação das isoformas da proteína p53 com a família das enzimas GSTM1 mostrou que no grupo estudo, os casos GSTM1 estavam distribuídos em 9 (20,93%) casos ARG/ARG, 6 (13,95%) casos ARG/PRO e nenhum caso era homozigoto para prolina. Nesse mesmo grupo, o alelo nulo GSTM1\*0 foi encontrado em 15 (34,88%) casos com ARG/ARG, 12 (27,91%) casos ARG/PRO e houve 1 (2,33%) caso homozigoto para prolina.

Do mesmo modo, no grupo controle, as amostras com GSTM1, foram subdivididas em 16 (18,60%) casos eram ARG/ARG, 20 (23,25%) casos eram ARG/PRO, e 1 (1,16%) era PRO/PRO. Em 21(24,42%) dos casos GSTM1\*0 foi observado a presença de ARG/ARG, em outros 26 (30,23%) casos ocorreu ARG/PRO e em 2 (2,32%) casos PRO/PRO (Figura 10).

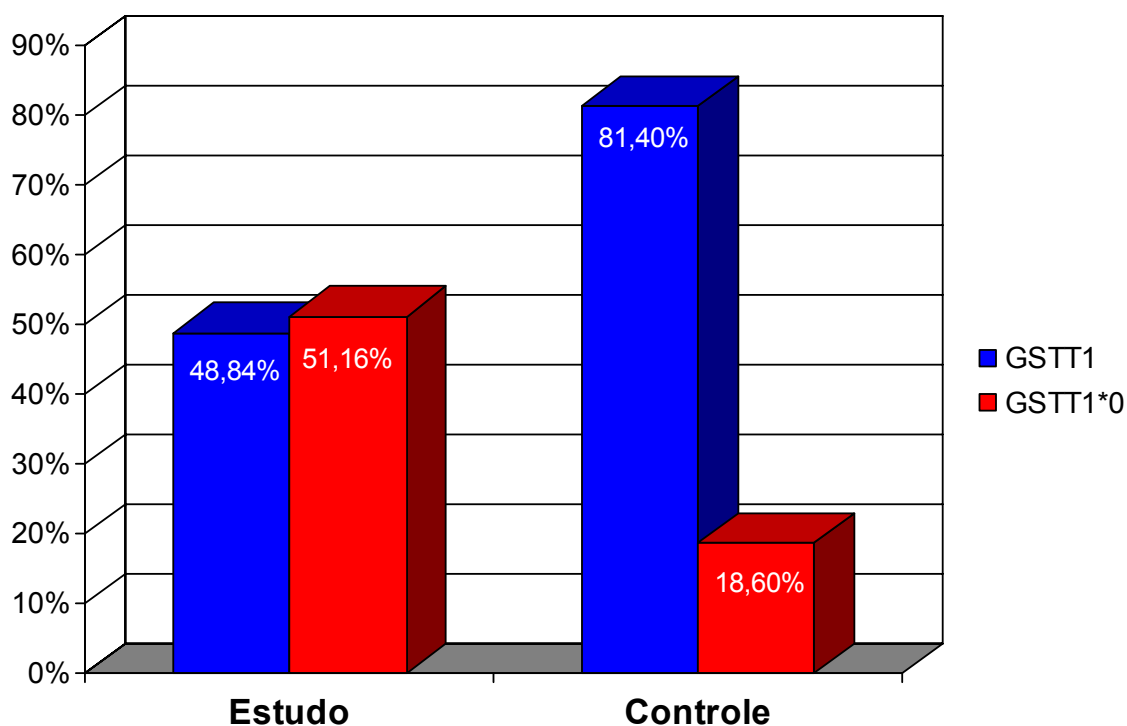


**Figura 10** – Distribuição associação das isoformas da proteína p53 com alelos da família GSTM1 nos grupos estudo e controle. Teste exato de Fisher:  $p=1,000$  (IC de 95%)

#### 4.8 Polimorfismo da família GSTT1

A avaliação da enzima GSTT1, com os alelos GSTT1 e GSTT1\*0 evidenciou no grupo estudo, a presença de GSTT1 em 21 (48,84%); casos enquanto o alelo nulo (GSTT1\*0) foi encontrado em 22 (51,16%) dos casos.

No grupo controle a enzima GSTT1 fazia parte de 70 (81,40%) dos casos e o alelo GSTT1\*0 estava em 16 (18,60%) dos casos (Figura 11).



**Figura 11** – Distribuição dos alelos GSTT1 e GSTT1\*0 nos grupos de estudo e controle. Teste  $\chi^2$ :  $p=0,001$  (IC de 95%)\*.

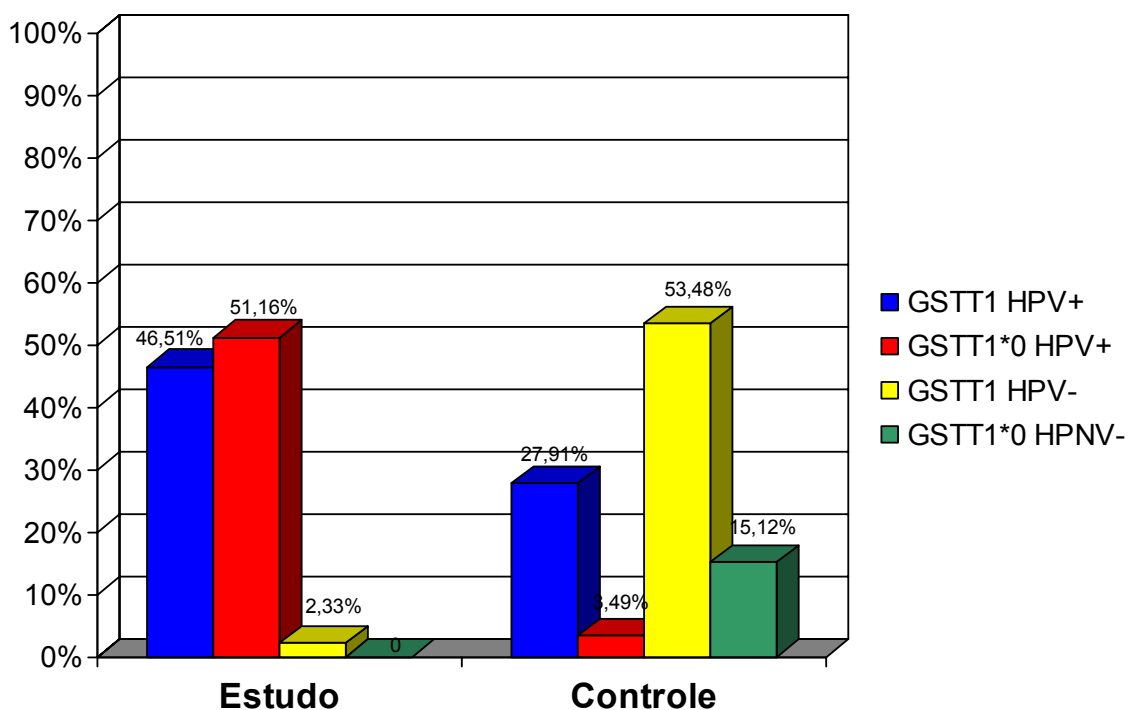
A análise de estimativa de máxima probabilidade, de razão de chances com intervalo de confiança de 95%, mostrou razão de chances de 4,58 vezes (IC de 95%: 2,041; 10,28) ( $p<0,001$ ) para presença de GSTT1\*0.

#### 4.9 Associação da presença de HPV com a família GSTT1

A análise de HPV associado à enzima GSTT1 também foi verificada. No grupo estudo, observou-se, em presença de HPV-DNA, serem GSTT1 20 (46,51%) dos casos e 22 (51,16%) dos casos GSTT1\*0.

A mesma avaliação no grupo controle identificou 24 (27,91%) dos casos com GSTT1 e 3 (3,49%) estavam relacionados ao alelo nulo GSTT1\*0.

Nos casos negativos para o HPV, o grupo estudo apresentou somente um caso (2,33%) GSTT1 e nenhum caso GSTT1\*0. No grupo controle havia 46 (53,48%) casos GSTT1 e 13 (15,12%) casos GSTT1\*0 (Figura 12).



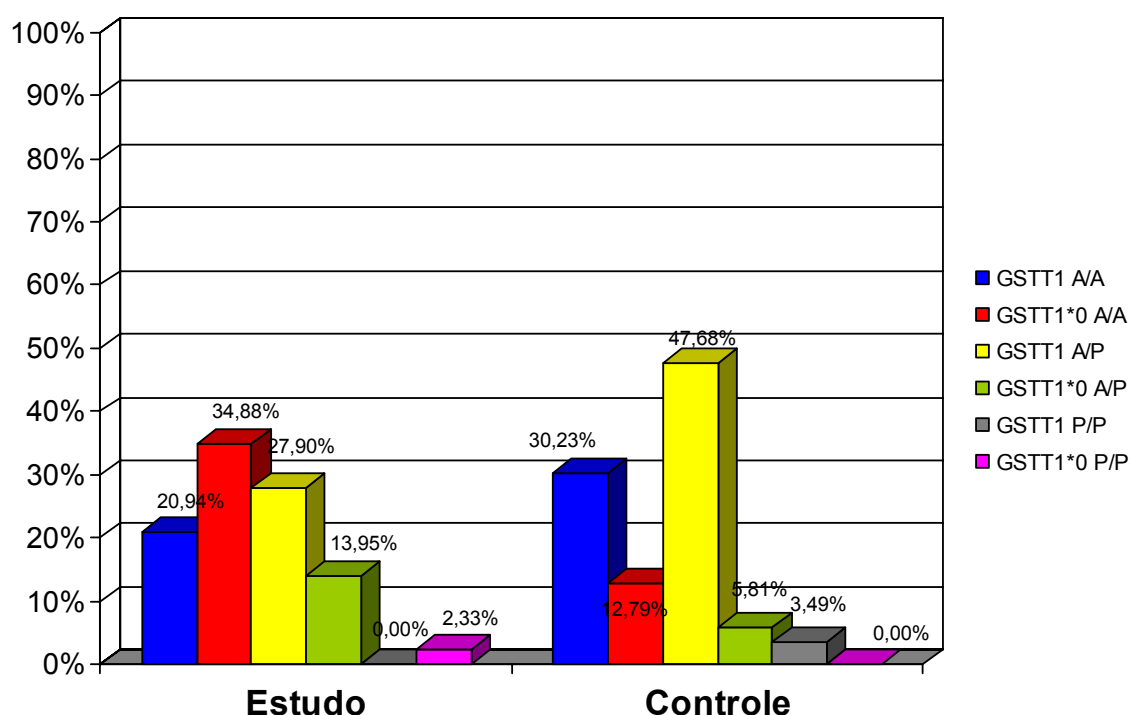
**Figura 12** – Distribuição da associação da presença viral com alelos da família GSTT1, nos grupos de estudo e controle. Teste exato de Fisher:  $p < 0,001$  (IC de 95%)\*

A análise de estimativa de máxima probabilidade, de razão de chances com intervalo de confiança de 95%, mostrou razão de chances de 6,6 vezes (IC de 95%: 1,993; 22,172) ( $p < 0,001$ ) para associação do HPV com GSTT1\*0 e 0,15 (IC de 95%: 0,045; 0,502) ( $p = 0,0021$ ) para associação do HPV com GSTT1.

#### 4.10 Associação do polimorfismo da p53 e família GSTT1

A associação das isoformas da proteína p53 com a família das enzimas GSTT1 mostrou que, no grupo estudo, os casos GSTT1 estavam distribuídos em 9 (20,94%) casos ARG/ARG; em 12(27,90%) casos ARG/PRO e nenhum caso era homocigoto para prolina. Nesse mesmo grupo, nos casos em que havia o alelo nulo GSTT1\*0 em 15 (34,88%) eram ARG/ARG, 6 (13,95%) eram ARG/ARG e um (2,33%) caso era homocigoto para prolina.

Do mesmo modo, no grupo controle, as amostras com GSTT1 foram subdivididas em 26 (30,23%) casos ARG/ARG; 41 (47,68%) casos ARG/PRO e 3 (3,49%) PRO/PRO. Quando o alelo presente era GSTT1\*0, 11(12,79%) dos casos apresentavam ARG/ARG; 5 (5,81%) ARG/PRO e nenhum caso era PRO/PRO (Figura 13).



**Figura 13** – Distribuição da associação das isoformas da proteína p53 com alelos da família GSTT1. Teste exato de Fisher:  $p = 0,056$  (IC de 95%)\*.

#### **4.11 Associação das famílias GSTM1 e GSTT1**

A avaliação da associação entre as famílias GSTM1 e GSTT1 foi realizada por modelo de regressão logística. Fato esse que permitiu concluir não ser a família GSTM fator prognóstico para adenocarcinoma do colo uterino, tanto em forma isolada, quanto associada à família GSTT1.

---

## **5. *DISCUSSÃO***

---

---

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima para 2006 ocorrência de 19.260 casos novos de câncer de colo uterino, com risco estimado de 20 casos a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde, 2006). Como a incidência de adenocarcinoma corresponde a 22,5% das neoplasias malignas do colo uterino (Smith et al., 2000), pode-se concluir que 4333 daqueles casos serão de adenocarcinomas.

Estes dados motivam o estudo dessa neoplasia maligna, uma vez que sua incidência está aumentando. A maioria das pesquisas está voltada para a variedade espinocelular que, graças aos programas de rastreamento, mostra diminuição de incidência (Herbert et al., 2001; Sasieni, Adams, 2001).

Apesar do HPV de alto risco oncogênico ser sobejamente conhecido como fator causal da neoplasia do colo uterino, diversos cofatores facilitam a progressão da infecção induzida pelo HPV, alterando a história natural desse tumor maligno (Crum, 2000; Au, 2004; Ferreira et al., 2006).

Entre esses cofatores estariam as alterações da proteína p53 e as famílias das enzimas metabolizadoras fase II GSTM1 e GSTT1.

A população selecionada para este ensaio foi composta por 144 mulheres, sendo 44 com de adenocarcinoma no grupo de estudo e 100 mulheres no grupo controle. Nestas, foi comprovada a ausência de qualquer tipo de neoplasia intra-epitelial ou invasora do trato genital inferior por meio dos exames colposcópico e colpocitológico.

Quanto à variedade histológica tumoral, houve predomínio do adenocarcinoma mucinoso tipo endocervical, estando de acordo com a classificação de Zaino (2000).

Como anteriormente pormenorizado, as populações estudo e controle foram remodeladas por vários motivos: ausência de amplificação do DNA, não amplificação da p53 e das enzimas GST, além de irregularidades no pareamento etário. O grupo estudo passou a ter 43 amostras de adenocarcinomas e o grupo controle ficou constituído por 86 amostras do DNA de células endocervicais.

O cálculo da média de idade no grupo estudo foi de 52,48 anos.

---

Nos 86 casos do grupo controle, a idade variou de 25 a 81 anos com média de 48,06 anos. Pela aplicação do teste de t Student ( $p=0,1042$ ) concluiu serem os grupos estudo e controle homogêneos.

A média etária das portadoras de adenocarcinoma neste estudo foi superior aos relatos de Pirog et al. (2000) referido como 45,2 anos e de Bulk et al. (2003) com média de 44 anos. Também foi superior aos dados informados por Herbert et al. (2001), onde 59% dos adenocarcinomas ocorreram em mulheres com menos de 50 anos.

Por outro lado Hopkins e Morley (1991), ao estabelecerem comparações entre as variedades adenocarcinoma e carcinoma espinocelular do colo uterino, verificaram a ocorrência desses tumores em mulheres com idade de 50,4 anos e 49,9 anos respectivamente. Da mesma forma, Lea et al. (2002) e Baalbergen et al. (2004), mostraram média de idade em suas séries de 53 e 52 anos, respectivamente para o adenocarcinoma cervical.

O papilomavírus humano esteve presente em 31,40% amostras do grupo controle e em 97,67% casos de adenocarcinomas, com diferença estatisticamente significativa ( $p=0,001$ ). Com esses dados é possível estimar o risco para desenvolver adenocarcinoma em presença do HPV em 113,8 vezes (I.C. a 95%: 13,67; 947,14) - ( $p<0,001$ ), quando comparado às não portadoras dessa infecção viral.

Os achados estão de acordo com Pirog et al. (2000), que relataram o achado do DNA-HPV em 82 (91%) de 90 casos de adenocarcinomas mucinosos do tipo endocervical. Castellsagué et al. (2006), de igual maneira, verificaram a presença de DNA do HPV em 93% das pacientes, associada ao aumento de 81 vezes no risco de adquirir adenocarcinoma.

O polimorfismo da proteína p53 foi analisado. Observou-se, no grupo estudo, homozigose para arginina em 55,81% dos casos, seguindo-se a heterozigose (ARG/PRO) em 41,86% dos adenocarcinomas restando apenas um caso para a homozigose prolina. O grupo controle mostrou resultados semelhantes ao grupo estudo ( $p=0,397$ ). Sendo assim, o polimorfismo da p53 no códon 72 não participa da geração do adenocarcinoma do colo uterino na população analisada.

---



Outros ensaios brasileiros mostram proporções semelhantes com baixo número de casos PRO/PRO ou ausência dessa isoforma da p53 (Drummond et al., 2002; Brenna et al., 2004; Cortezzi et al., 2004).

Parece haver distribuição das isoformas da proteína p53, de acordo com latitude geográfica. O alelo prolina é mais freqüente em pessoas naturais da região equatorial enquanto o afluxo do alelo arginina aumenta tanto mais quanto mais distante a população está da linha do Equador (Beckman et al., 1994; Pietsch, 2006).

Esta afirmativa foi confirmada por Siddique et al. (2005) estudando a expressão dos alelos PRO e ARG em asiáticos, chineses, sadios heterozigotos (PRO/ARG), moradores de região próxima da linha do Equador, comparados a caucasianos, poloneses, também sadios e portadores da mesma heterozigose. O alelo PRO era mais comum entre os chineses sadios quando comparados com os poloneses, nos quais o alelo ARG era o predominante. Fato que tornava os caucasianos duas vezes mais propensos a apresentar câncer do que o grupo asiático.

A associação do polimorfismo da p53 com a presença do HPV também foi avaliada. Houve predomínio do alelo arginina na isoforma homozigótica (ARG/ARG) ou heterozigótica (ARG/PRO), tanto nos adenocarcinomas quanto no grupo controle em nosso estudo. A análise estatística não mostrou diferença significativa ( $p=0,653$ ). Por conseguinte, nessa população a associação do polimorfismo da p53 no códon 72 e o HPV não participam da carcinogênese dos adenocarcinomas. Estes achados estão de acordo com os resultados obtidos por Hildesheim et al. (1998) e Gustafsson et al. (2001) em suas séries de adenocarcinoma.

De modo contrário, Anderson et al. (2001) e Yang et al. (2001), encontraram diferenças significantes, porém a associação do polimorfismo da p53 e presença do HPV no desenvolvimento dos adenocarcinomas do colo uterino foi considerada fraca. Resultado diferente do obtido por Storey et al. (1998) ao analisarem amostras de carcinoma espinocelular do colo uterino.

---

Em metanálise considerando 50 publicações relacionadas à associação da p53 com a carcinogênese do colo uterino Koushik et al. (2004), observaram ser discreto o efeito da isoforma ARG/ARG sem considerar o tipo histológico do tumor, na carcinogênese cervical. O risco relativo seria 1,1 vezes maior para portadoras de ARG/ARG em relação às duas outras isoformas. Quando o tipo histológico da neoplasia cervical era especificado, o risco relativo para adquirir carcinomas espinocelulares seria de 1,5 vezes e de 1,7 vezes para adenocarcinomas.

A provável participação da enzima metabolizante da fase II, GSTM1, na carcinogênese do adenocarcinoma foi avaliada pela análise dos alelos GSTM1 e GSTM1\*0.

Verificamos predomínio da GSTM1 no grupo controle esta enzima estava presente em 43,02% dos casos analisados. No grupo estudo esse alelo foi encontrado em apenas 34,88% dos tumores. O alelo GSTM1\*0, considerado alelo nulo, foi prevalente nos adenocarcinomas (65,12%). Desse modo, na população estudada, os valores encontrados sugerem que a família da enzima GSTM1 não participaria da carcinogênese dos adenocarcinomas ( $p = 0,347$ ).

A associação da família GSTM1 com presença de DNA do HPV, no grupo controle, aconteceu em maior número em mulheres sem infecção pelo HPV e enzima GSTM1 ausente. No grupo estudo, somente uma paciente era HPV negativa e com a enzima GSTM1 presente correspondendo a 2,33% do grupo. A análise não mostrou significância ( $p=0,256$ ).

Desse modo, na população estudada, a associação do HPV com a família GSTM1 não participaria da carcinogênese dos adenocarcinomas.

Na associação do polimorfismo da p53 no códon 72 e a família GSTM1, houve predomínio do alelo nulo GSTM1\*0 no grupo controle associado à ARG/PRO (30,23%). No grupo estudo também houve predomínio do alelo nulo GSTM1\*0 associado com ARG/ARG (34,88%). O alelo GSTM1 foi detectado em menor número nos dois grupos. A análise estatística não mostrou associação significativa entre a família de enzimas GSTM1 e as isoformas da proteína p53 ( $p= 0,893$ ).

---

Assim, podemos inferir que, na população avaliada, tanto a enzima GSTM1 quanto seu alelo GSTM1\*0, não participariam da carcinogênese do adenocarcinoma do colo uterino.

A contribuição da enzima GSTT1 na carcinogênese dos adenocarcinomas foi avaliada pela análise dos alelos GSTT1 e GSTT1\*0.

Houve predomínio da enzima GSTT1 no grupo controle (81,40%) enquanto o alelo nulo GSTT1\*0 foi mais freqüente entre os adenocarcinomas (51,16%) ( $p=0,001$ ). O risco relativo de uma portadora do genótipo GSTT1\*0 de desenvolver adenocarcinoma do colo uterino foi 4,6 vezes maior em comparação com as portadoras de GSTT1.

Na análise da associação entre HPV e a família GSTT1 observou-se no grupo estudo predomínio do alelo nulo GSTT1\*0 e presença de HPV (51,16%). Entre os casos negativos para o HPV, no grupo controle, houve predomínio de GSTT1 (53,48%) ( $p<0,001$ ).

O risco relativo de portadoras de infecção pelo HPV com genótipo GSTT1\*0 adquirirem adenocarcinoma seria 6,6 vezes maior do que aquelas portadoras de GSTT1. Por outro lado, frente a infecção por HPV, a enzima metabolizadora GSTT1 exerceria função protetora.

O estudo da associação da família GSTT1 com polimorfismos da proteína p53 no códon 72 evidenciou, no grupo controle, maioria de mulheres portadoras da enzima GSTT1, estando em 47,68% dos casos associados à isoforma ARG/PRO. Os casos portadores do alelo nulo GSTT1\*0, exibiram em 12,79% das vezes a isoforma ARG/ARG.

No grupo estudo, a enzima GSTT1 fez parte de 20,94% do genótipo ARG/ARG e de 27,90% da isoforma ARG/PRO. Enquanto o alelo nulo GSTT1\*0 correspondeu a 34,88% dos casos com ARG/ARG. Contudo a análise estatística desenvolvida pelo teste exato de Fisher não mostrou significância evidente ( $p=0,056$ ). Esse fato sugere que haveria tendência à participação na carcinogênese do adenocarcinoma. Assim, a associação das isoformas da proteína p53 com a família GSTT1 dever-se-ia à participação do alelo nulo GSTT1\*0.

---

Foi ainda realizada análise de regressão logística para a associação das famílias das enzimas metabolizadoras GSTM1 e GSTT1 na carcinogênese do colo uterino. Não ocorreu associação dessas famílias de enzimas, tanto no grupo controle quanto no grupo estudo. Ao que parece, somente a família GSTT1 teria valor prognóstico nos adenocarcinomas.

As diversas publicações relativas à participação das enzimas metabolizadoras GSTM1, GSTT1 e seus alelos nulos na carcinogênese apresentam resultados conflitantes.

Há trabalhos relatando a não participação dessas enzimas tanto isoladas quanto associadas entre si. Outros sugerem aumento de risco, porém sem significância estatística (Chen et al., 1999; Goodman et al., 2001; Sharma et al., 2004; Sobti et al., 2006).

Estudo realizado por Chen e Nirunsuksiri (1999), utilizando cultura de queratinócitos do epitélio cervical em monocamada, tornou evidente que células positivas para GSTM1, transfectadas com HPV 16E6 ou HPV16 E6/E7 apresentavam atividade cinco vezes menor sobre o substrato óxido trans-estilbeno, quando comparadas com células GSTM1 positivas, porém sem HPV. Assim, os autores concluíram que a infecção promovida pelo HPV poderia ter efeito sobre a atividade da GSTM1 constituindo possível explicação pela falta de associação entre os genótipos GSTM1 e risco de câncer cervical.

A observação do alelo nulo GSTM1\*0 avaliada por vários autores nos carcinomas cervicais mostra risco relativo de 2,3 a 3,5 vezes de favorecer a carcinogênese do colo uterino em portadoras de infecção por HPV (Kim et al., 2000; Au et al., 2003; Lee et al., 2004; Joseph et al., 2006). Divergem apenas na associação com o polimorfismo da p53, ARG/PRO e ARG/ARG, Kim et al. (2000) e Lee et al. (2004).

Ueda et al. (2003) analisaram o comportamento das isoformas das famílias GSTM1 e T1 em 104 linhas celulares de tumores humanos. Dessas, 14 eram de neoplasia do colo uterino. Verificaram que o genótipo GSTM1\*0 foi dominante em células de tumores renais, ovarianos e de pequenas células nos pulmões. Contudo, a isoforma GSTT1\*0, predominou em células de câncer do colo uterino e endométrio.

---

Observaram ainda a predominância de GSTM1\*0 associada à p53/ARG nas linhas celulares de câncer de pulmão. Enquanto a GSTT1\*0 encontrou-se associada à p53/PRO, em todas as 104 linhas celulares.

Em outro estudo, Ueda et al. (2005), ao analisarem a associação de GSTM1 e T1 com a proteína p53 em neoplasias intra-epiteliais do colo uterino (NIC), verificaram associação do genótipo GSTT1\*0 à NIC de alto grau, enquanto que a associação do polimorfismo da p53 seria pouco provável no início da carcinogênese dos tumores espinocelulares.

Nossos resultados assemelham-se aos descritos por Ueda et al. (2005), embora o tipo histológico analisado por aqueles pesquisadores tenha sido o espinocelular.

Embora populares, os estudos de associações, entre traços gênicos complexos e doenças comuns, são marcados por falta de reprodutibilidade. As razões prováveis resumem-se em três possíveis causas: associação falso-positiva, que corrigida não seria replicada; associação verdadeira, que falharia em ser replicada em estudo de baixo poder estatístico, e nessa circunstância seria um estudo falso-negativo; associação verdadeira em uma determinada população poderia não ocorrer em outra, em função de heterogeneidade genética ou de fundo ambiental (Newton-Cheh, Hirschhorn 2005).

De acordo com metanálise realizada por Ioannidis et al. (2003), somente 16% das associações genéticas identificadas foram subsequentemente replicadas com significância estatística formal sem heterogeneidade ou viés.

Não foi possível, em nossa pesquisa, estabelecer comparações reais quanto à reprodutibilidade. Na literatura compulsada, encontramos o relato de Sobti et al. (2006) citando onze casos de adenocarcinoma como parte de seu grupo estudo de 103 tumores do colo uterino.

Em nosso trabalho, embora enfocando adenocarcinoma do colo uterino, as comparações das associações foram feitas com a variedade espinocelular, apesar de até o momento não se identificar corretamente as diferenças ou semelhanças entre ambas as variedades da neoplasia cervical.

---

Desta forma, este estudo é o primeiro a analisar as associações entre HPV, polimorfismo da proteína p53 no códon 72 e isoformas das enzimas metabolizadoras GSTM1 e GSTT1 em adenocarcinomas do colo uterino.

Outros trabalhos deverão ser realizados para confirmar ou refutar os dados relatados nesta pesquisa.

A replicação e duplicação do mesmo estudo fazem-se, portanto, necessárias para confirmar ou não os resultados por nós auferidos, quiçá com maior número de casos.

---

## **6. CONCLUSÕES**

---

---

Pelo exposto pode-se concluir:

1. O HPV foi encontrado em 97,67% dos adenocarcinomas do colo uterino. Mulheres com infecção por papilomavírus humano teriam risco relativo de 113,79 vezes de desenvolver essa neoplasia quando comparadas às não portadoras da infecção;
  2. Os polimorfismos da proteína p53 no códon72 e as variantes polimórficas GSTM1 e GSTM1\*0, não participariam da carcinogênese do adenocarcinoma cervical uterino na população analisada;
  3. As variantes polimórficas GSTT1 e GSTT1\*0 participaram da carcinogênese dos adenocarcinomas. Mulheres com genótipo GSTT1\*0 apresentam risco relativo 4,6 vezes maior de apresentar adenocarcinoma do colo uterino do que as com genótipo de GSTT1. Mulheres infectadas pelo HPV e com genótipo GSTT1\*0 possuiriam risco relativo 6,6 vezes maior de adquirir adenocarcinoma do colo uterino do que a portadora de GSTT1 sem a infecção viral. A presença da enzima GSTT1 em mulheres infectadas pelo HPV seria um fator de proteção na carcinogênese do adenocarcinoma do colo uterino, com risco relativo de 0,15.
  4. Não existiriam associações entre as variantes polimórficas GSTM1 e GSTM1\*0 com GSTT1 e GSTT1\*0.
-



## **7. ANEXOS**

---

---

## Anexo 1. Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

São Paulo, 10 de outubro de 2003

CEP Nº 1051/03

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): CARMEN REGINA NOGUEIRA DE CARVALHO

Disciplina/Departamento: Ginecologia

Ref.: Projeto de Pesquisa

O polimorfismo do códon 72 da proteína P53 e o papilomavírus humano no adenocarcinoma do colo uterino

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto acima.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em **07/04/04**

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."

**Anexo 2.** Carta da U.E.S. de Anatomia Patológica FCM Santa Casa de São Paulo



**Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo**  
**U.E.S. de Anatomia Patológica**  
C.C. 010061001

---

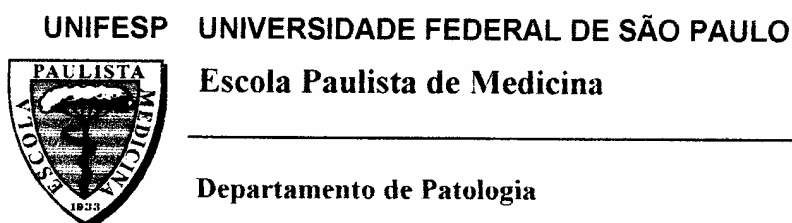
**DECLARAÇÃO**

*Declaro que a Dra. Carmen Regina Nogueira de Carvalho foi autorizada a utilizar material de peças cirúrgicas do nosso Serviço de Anatomia Patológica, como complemento de sua tese sobre Adenocarcinoma do Canal Cervical Uterino.*

*Atenciosamente,*

*Prof. Dr. José Donato de Próspero*  
*Diretor da U.E.S. de Anatomia Patológica*

**Anexo 3.** Carta do Departamento de Patologia da UNIFESP-EPM



DECLARAÇÃO

Declaro que forneci 12 blocos de parafina obtidos de pacientes com adenocarcinoma de colo uterino para a realização de trabalho de tese de CARMEN REGINA N. DE CARVALHO, CRM 16.003, a ser realizado no Laboratório de Ginecologia Experimental. Declaro ainda minha concordância com o trabalho a ser realizado.

São Paulo, 10 de abril de 2002.

Prof. Dr. João Norberto Stávale

Professor Adjunto-Doutor do Departamento de Patologia

---

**Anexo 4.** Carta do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer**IB.C.C. - INSTITUTO BRASILEIRO DE CONTROLE DO CÂNCER**

Hospital Prof Dr. João Sampaio Góes Jr.

Reconhecido de utilidade pública Federal nº 95.025/87, Estadual nº 9880/77 e Municipal nº 14747/77

São Paulo, 01 de novembro de 2000.

Dra. Carmen Regina Nogueira de Carvalho

Vimos informar que sua solicitação para utilização dos blocos de parafina contendo espécimes cirúrgicos de Adenocarcinoma do Colo do Útero do IBCC, para desenvolvimento de tese de doutorado sobre as possíveis mutações do gene supressor de tumores PTEN/MMAC1 nos tumores malignos do colo do útero, foi analisada e aprovada pela Comissão de Trabalhos Científicos – CTC do IBCC.

Ficou estabelecido, pela CTC que:

- o nome do IBCC deverá ser incluído nas referências e agradecimentos e
- quando o trabalho for referido em congressos ou simpósios ou quando da sua publicação, deverá constar o nome do Diretor Técnico Científico Dr. João Carlos Sampaio Góes no final da relação de autores, como representante da Instituição,
- as despesas referentes à execução do trabalho, inclusive honorários do técnico, deverão correr por conta da investigadora do projeto.

Atenciosamente,

**Dra. Célia Tosello de Oliveira**  
Coordenadora de Pesquisa do CEJSG

## Anexo 5. Carta do Laboratório CEDIG



Centro de Diagnóstico  
de Guarulhos

- Médica Responsável: Helena Müller - CRM 9495
- Prof. Adjunto do Departamento de Ciências Patológicas da Faculdade de Medicina da Santa Casa de São Paulo.
- Chefe da Clínica Adjunto do Serviço de Anatomia Patológica da Santa Casa de São Paulo.
- Membro da Internacional Society of Dermatopathology
- Membro da Sociedade Brasileira de Mastologia

### Declaração

Declaro que este laboratório forneceu bloco de parafina contendo  
“Adenocarcinoma do canal cervical uterino” para fazer parte do material da  
tese da Dra. Carmen Regina M. Carvalho, assim como concordamos com a  
pesquisa.

  
**Dra. Helena Müller**  
**CRM 9.495**

## Anexo 6. Carta do Laboratório LABPAC

**LABPAC**DR. CARLOS MARIGO  
DR. JOSÉ DONATO DE PRÓSPERO  
DR. CARLOS D'ANDRETTA NETO  
DR. SÉRGIO R. ROCHA DE ARAUJO  
DR. LUIZ FERNANDO M. BARREZUETAHOSPITAL SANTA CATARINA  
Laboratório Oficial de Anatomia  
Patológica e Citologia

São Paulo, 07 de março de 2002

Declaro que fornecemos bloco de parafina N.º 267155 contendo amostra de Adenocarcinoma do Canal Cervical uterino para trabalho de Dr.ª. Carmen Regina Nogueira de Carvalho e estamos de acordo com o seu uso para fins científicos.

Colocamo-nos a disposição para esclarecimentos que se fizerem necessários,

Atenciosamente.

Dr. Sergio Ricardo Rocha de Araujo

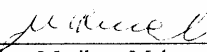
## Anexo 7. Carta do Laboratório SAE



### DECLARAÇÃO

Declaro que a Dra. Carmen Regina Nogueira de Carvalho foi autorizada a utilizar o excedente do material de coleta endocervical para exame de citologia oncológica, realizado por nosso Laboratório, como complemento de sua tese sobre Adenocarcinoma do colo uterino.

São Paulo, 02 de julho de 2003.

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Marilene Melo  
Diretora Médica

**SAE - Serviços de Análises Especializadas LTDA.**

Rua Cubatão, 196 - Paraíso - São Paulo - SP - CEP: 04013-000 - Tel.: (11) 3889-7200 - Fax: (11) 3889-0109  
CNPJ - 61.720.967/0001-32 - VIGILÂNCIA SANITÁRIA: 104209.0101 - CRM 9756  
RESPONSÁVEL TÉCNICO: DR. EVALDO MELO - CRM SP 7.821

[www.sae.com.br](http://www.sae.com.br)



## Anexo 8. Termo de Consentimento Informado

### TERMO DE CONSENTIMENTO

Você está sendo convidada a participar de um estudo sobre adenocarcinoma do colo uterino.

Solicitamos que você leia atentamente este documento onde terá uma explicação dos objetivos da pesquisa e esclarecimento dos procedimentos a serem realizados.

**Título do Projeto** – Os Polimorfismo da Proteína p53 no códon 72 e das Glutinationas-S- Transferases no Adenocarcinoma Do Colo Uterino.

**Informações sobre o objetivo da pesquisa** - O câncer de colo uterino é bastante freqüente. Entre os tumores malignos ginecológicos só está atrás do câncer de mama. Ele surge devido a uma infecção persistente produzida pelo papilomavírus humano (HPV) em algumas mulheres com comportamento de risco para esta neoplasia isto é: fumantes, com muitos parceiros sexuais, que iniciaram vida sexual antes dos 18anos, etc.

O adenocarcinoma do canal endocervical é um tipo de câncer de colo uterino que está se tornando bastante freqüente. Para conhecê-lo melhor e com isto estabelecer tratamentos mais eficazes, pesquisas envolvendo técnicas de biologia molecular têm sido realizadas em muitos países. Este trabalho servirá para descobrir se o alelo arginina / arginina da proteína nuclear p53 facilita a ação do HPV no aparecimento do adenocarcinoma do canal endocervical.

A curto prazo, esta pesquisa não trará benefícios. Mas no futuro auxiliará na prevenção e tratamento desta neoplasia.

**Participação no Trabalho-** Se você é portadora de adenocarcinoma endocervical e quiser participar, basta consentir que durante o exame colposcópico com biopsia dirigida, que seja retirado um fragmento para análise.

Se você não é portadora da neoplasia, poderá participar no **grupo controle**. Para isto necessita permitir retirada de células endocervicais com escovinha de coleta endocervical. Este procedimento é indolor, causa pouco desconforto que é o mesmo que acontece na coleta de material para o exame citologia oncológica(exame de Papanicolaou) para prevenção de câncer

**Custos e Confidencialidade** - *Esta participação não terá custos. As informações desta pesquisa médica estarão aos cuidados dos médicos e coordenadores responsáveis pelo andamento do estudo. Poderão ser inspecionadas pelo Comitê de Ética Médica Institucional e apresentadas em encontros ou publicações. Entretanto, sua identidade não será revelada em nenhum momento. A investigadora principal da pesquisa é Dra. Carmen Regina Nogueira de Carvalho que poderá ser encontrada no Ambulatório de Onco-Ginecologia (sala 8) no prédio dos ambulatórios situado na rua Pedro de Toledo 750 fone: 5576-4150. Caso haja qualquer duvida ou desejar fazer comentários sobre a ética da pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa UNIFESP-EPM. Na Rua Botucatu 572 – 1º andar - fone: 5571-1062.*

---

**Considerações finais** - Em caso de eventual dano pessoal diretamente causados pelos procedimentos propostos nesse estudo e devidamente comprovados, a participante terá direito a tratamento na Instituição e às indenizações legalmente estabelecidas.

Confirmando ter sido devidamente informada e revisado o texto precedente relativo à pesquisa intitulada: **O POLIMORFISMO DA PROTEÍNA P53 E O PAPILOMAVÍRUS HUMANO NO ADENOCARCINOMA ENDOCERVICAL DO COLO UTERINO.**

Discuti com Dra. Carmen Regina Nogueira de Carvalho, sobre minhas dúvidas e decisão de participar do estudo.

Ficaram claros para mim os propósitos do estudo, o procedimento a ser realizado tanto para o grupo de estudo como para grupo controle, seu desconforto e risco, as garantias de confidencialidade. Portanto concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

-----  
Assinatura da paciente ou seu representante legal

-----  
Assinatura da testemunha

Eu, Carmen Regina N. de Carvalho, declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO desta paciente ou seu representante legal para a participação neste estudo.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

-----  
Assinatura da pesquisadora

---

## ***7. REFERÊNCIAS***

---

---

- Alexandrie AK, Rannug A, Juronen E, Tasa G, Warholm M. Detection and characterization of a novel functional polymorphism in the *GSTT1* gene. *Pharmacogenetics*. 2002;12:613-9.
- Alfsen GC, Kristensen GB, Skovlund E, Pettersen EO, Abeler VM. Histologic subtypes has minor importance for overall survival in patients with adenocarcinoma of uterine cervix: a population-based study of prognosis factors in 505 patients with nonsquamous cell carcinomas of the cervix. *Cancer*. 2001;92:2471-83.
- Altekruse SF, Lacey JV Jr, Brinton LA, Gravitt PE, Silverberg SG, Barners WA Jr. Comparison of human papillomavirus genotypes, sexual, and reproductive risk factors of cervical adenocarcinomas and squamous cell carcinoma: Northeastern United States. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;188:657-63.
- Andersson S, Rylander E, Strand A, Sällström J, Wilander E. The significance of p53 codon 72 polymorphism for the development of cervical adenocarcinomas. *Br J Cancer*. 2001;85(8):1153-6.
- Au WW, Sierra-Torres CH, Tyring SK. Acquired and genetic susceptibility to cervical cancer. *Mutat Res*. 2003;544:361-4.
- Au WW. Life style, environmental and genetic susceptibility to cervical cancer. *Toxicology*. 2004;198:117-20.
- Ayhan A, Al RA, Baykal C, Demirtas E, Yüce K, Ayhan A.. A comparison of prognoses of FIGO stage IB adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2004;14:279-85.
- Baalbergen A, Ewing-Graham PC, Hop WC, Struijk P, Helmerhorst TJ. Prognostic factors in adenocarcinomas of uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 2004;92:262-7.
- Baccouche S, Mabrouk I, Said S, Mosbah A, Jlidi R, Gargouri A. A more accurate detection of codon 72 polymorphism and LOH of the TP53 gene. *Cancer Lett*. 2003;189:91-6.
- Baxter SW, Thomas EJ, Campbell IG. *GSTM1* null polymorphism and susceptibility to endometriosis and ovarian cancer. *Carcinogenesis*. 2001;22(1):63-5.
- Beckman G, Birgander R, Sjaländer A, Saha N, Holmberg PÅ, Kivelä A, et al. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered*. 1994;44:266-70.
- Beeghly A, Katsaros D, Chen H, Fracchioli S, Zhang Y, Massobrio M, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and ovarian cancer treatment and survival. *Gynecol Oncol*. 2006;100:330-7.
- Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*. 2005;32S:S1-S6.
-

---

Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55:244-65.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativas 2006: incidência de câncer no Brasil [monografia na Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2005 [citado 2006 Jan 9]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>.

Brenna SMF, Silva ID, Zeferino LC, Pereira JS, Martinez EZ, Syrjänem KJ. Prognostic value of P53 codon 72 polymorphism in invasive cervical cancer in Brazil. *Gynecol Oncol.* 2004;93:374-80.

Brooks LA, Tidy JA, Gusterson B, Hiller L, O'Nions J, Gasco M, et al. Preferential retention of codon 72 arginine p53 in squamous cell carcinoma of the vulva occurs in cancer positive and negative for human papillomavirus. *Cancer Res.* 2000;60:6875-7.

Buchman VL, Chumakov PM, Ninkina NN, Samarina OP, Georgiev GP. A variation in the structure of the protein-coding region of the human *p53* gene. *Gene.* 1988;70:245-52.

Bulk S, Visser O, Rozendaal L, Verheijen RH, Meijer CJ. Incidence and survival rate of women with cervical cancer in the Greater Amsterdam area. *Br J Cancer.* 2003;89:834-9.

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

Cáceres DD, Iturrieta J, Acevedo C, Huidobro C, Varela N, Quiñones L. Relationship among metabolizing genes, smoking and alcohol used as modifier factors on prostate cancer risk: exploring some gene-gene and gene-environment interactions. *Eur J Epidemiol.* 2005;20:79-88.

Calegari-Jacques SM. Distribuição t. In: Calegari-Jacques SM Bioestatística princípios e aplicações. 1ª reimpressão. Porto Alegre: Artmed; 2003. p.62-7.

Calegari-Jacques SM. Distribuição qui-quadrado. In: Calegari-Jacques SM Bioestatística princípios e aplicações. 1ª reimpressão. Porto Alegre: Artmed; 2003. p.129-43.

Calegari-Jacques SM. Testes não paramétricos. In: Calegari-Jacques SM Bioestatística princípios e aplicações. 1ª reimpressão. Porto Alegre: Artmed; 2003. p.165-84.

Callejas-Macias IE, Villa LL, Prado JC, Kalantari M, Allan B, Williamson A-L, et al. Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 2005;79(21):1360-40.

---

- 
- Canman CE, Replication checkpoint: preventing mitotic catastrophe. *Cur Biol.* 2001;11:R121-R124.
- Caporaso N. The molecular epidemiology of oxidative damage to DNA and cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(17):1263-5.
- Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet.* 1999;22:231-8.
- Carr J, Gyorfı T. Human papillomavirus. Epidemiology, transmission, and pathogenesis. *Clin Lab Med.* 2000;20(2):235-55.
- Castle PE, Giuliano AR. Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients-assessing their roles as human papillomavurs cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;31:29-34.
- Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 2002;89:191-9.
- Castellsagué X, Díaz M, Sanjosé S, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, et al. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: Implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(5):303-15.
- Cawkwell L, Quirke P. Direct multiplex amplification of DNA from a formalin fixed, paraffin wax embedded tissue. *Mod Pathol.* 2000;53(1):51-2.
- Cenci M, French D, Pisani T, Alderisio M, Lombardi AM, Marchese R. p53 polymorphism at codon 72 is not a risk factor for cervical carcinogenesis in central Italy. *Anticancer Res.* 2003;23:1385-8.
- Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, Drüst M, et al. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol.* 1992;66(4):2057-66.
- Chao A, Wang TH, Lee YS, Hsueh S, Chao AS, Chang TC, et al. Molecular characterization of adenocarcinoma and squamous carcinoma of the uterine cervix using microarray analysis of gene expression. *Int J Cancer.* 2006;119:91-8.
- Chen C, Madeleine MM, Weiss NS, Daling JR. Glutathione S-transferase *M1* genotypes and the risk of squamous carcinoma of the cervix: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol.* 1999;150(6):568-72.
- Chen C, Nirunsuksiri W. Decreased expression of glutathione S-transferase *M1* in HPV16-transfected human cervical keratinocytes in culture. *Carcinogenesis.* 1999;20(4):699-703.
-

---

Chen YC, Xu L, Guo YL, Su HJ, Smith TJ, Ryan LM, et al. Polymorphisms in *GSTT1* and p53 and urinary transitional cell carcinoma in south-western Taiwan: a preliminary study. *Biomarkers*. 2004;9(4-5):386-94.

Chen YC, Hunter DJ. Molecular epidemiology of cancer. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:45-54.

Cho NH, Lim SY, Kim YT, Kim D, Kim YS, Kim JW. G2 checkpoint in uterine cervical cancer with HPV 16 E6 according to p53 polymorphism and its screening value. *Gynecol Oncol*. 2003;90:15-22.

Chung HH, Kim MK, Kim JW, Park NH, Song YS, Kang SB, et al. *XRCC1 R399Q* polymorphism is associated with response to platinum-based neoadjuvant chemotherapy in bulky cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2006;103:1031-7.

Clementi M, Di Gianantonio E. Genetics susceptibility to infectious disease. *Reprod Toxicol*. 2006;21:345-9.

Coggan M, Whitbread L, Whittington A, Board P. Structure and organization of human Theta-class glutathione S-transferase and D-dopachrome tautomerase gene complex. *Biochem J*. 1998;334:617-23.

Coleman JO, Blake-Kalff MM, Davies TG. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartment. *Trends Plant Sci*. 1997;2(4):144-51.

Cooper B, Schineider S, Bohl J, Jiang Y-h, Beaudet A, Pol SV. Requirement of E6AP and features of human papillomavirus E6 necessary to support degradation of p53. *Virology*. 2003;306:87-90.

Cortezzi SS, Provazzi PJ, Sobrinho JS, Mann-Prado JC, Reis PM, Freitas SE, et al. Analysis of human papillomavirus prevalence and *TP53* polymorphism in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004;150:44-49.

Coultas L, Strasser A. The molecular control of DNA damage-induced cell death. *Apoptosis*. 2000;5:491-507.

Crawford D, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med*. 2005;56:303-20.

Crawford NP, Ziogas A, Peel DJ, Hess J, Anton-Culver H, Hunter KW. Germline polymorphisms in *SIPA1* are associated with metastasis and other indicators of poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res* [serial on internet]. 2006 [cited 2006 Mar 21];8(2):[about 9]. Available from: <http://breast-cancer-research.com/content/8/2/R16>.

Crum CP. Contemporary theories of cervical carcinogenesis: the virus, the host, and the stem cell. *Mod Pathol*. 2000;13(3):243-51.

---

- 
- D'Alo F, Voso MT, Guidi F, Massini G, Scardocci A, Sica S, et al. Polymorphisms of CYP1A1 and glutathione S-transferase and susceptibility to adult acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2004;89:664-670.
- Danaei G, Hoorn SV, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M. Comparative Risk Assessment Collaborating Group. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*. 2005;366:1784-93.
- Daniels PR, Sanders CM, Maitland NJ. Characterization of the interactions of human papillomavirus type 16 E6 with p53 and E6-associated protein in insect and human cell. *J Gen Virol*. 1998;79:489-99.
- Davies SM, Robison LL, Buckley JD, Radloff GA, Ross JA, Perentesis JP. Glutathione S-transferase polymorphisms in children with myeloid leukemia: a children's cancer group study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9:563-6.
- Depeille P, Cuq P, Mary S, Passagne I, Evrard A, Cupissol D, et al. Glutathione S-transferase M1 and multidrug resistance protein act in synergy to protect melanoma cells from vincristine effects. *Mol Pharmacol*. 2004;65:897-905.
- De Rijke B, Van Horssen-Zoetbrood A, Beekman JM, Otterud B, Maas F, Woestenenk R, et al. A frameshift polymorphism in *P2X5* elicits an allogenic cytotoxic T lymphocyte response associated with remission of chronic myeloid leukemia. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3506-16.
- Dimitrakakis C, Kymionis G, Diakomanolis E, Papaspyrou I, Rodolakis A, Arzimanoglou I, et al. The possible role of *p53* and *bcl-2* expression in cervical carcinomas and their premalignant lesions. *Gynecol Oncol*. 2000;77:129-36.
- Dokianakis DN, Spandidos DA. P53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of HPV-associated cervical cancer. *Mol Cell Biol Res Commun*. 2000;3:111-4.
- Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005;32S:S7-S15.
- Drummond SN, De Marco L, Pordeus-Ide A, Barbosa AA, Gomez RS. TP53 codon 72 polymorphism in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2002;22(6A):3379-81.
- Duell EJ, Holly EA, Bracci PM, Liu M, Wiencke JK, Kelsey KT. A population-based, case-control study of polymorphisms in carcinogen-metabolizing genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:297-306.
- Egan KM, Cai Q, Shu XO, Jin F, Zhu TL, Dai Q, et al. Genetic polymorphisms in *GSTM1*, *GSTP1*, and *GSTT1* and the risk for breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13:197-204.
-



El Hamidi A, Kocjan G, Du MQ. Clonality analysis of archival cervical smears correlation of monoclonality with grade and clinical behavior of cervical intraepithelial neoplasia. *Acta Cytol.* 2003;47:117-23.

Eluf-Neto J, Booth M, Muñoz N, Bosch FX, Meijer CJ, Walboomers JM. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br J Cancer.* 1994;69:114-9.

Fan R, Wu MT, Miller D, Wain JC, Kelsey KT, Wiencke JK, et al. The p53 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:1037-42.

Feinberg AP. The epigenetics of cancer etiology. *Semi Cancer Biol.* 2004;14:427-32.

Ferreira PM, Catarino R, Pereira D, Matos A, Pinto D, Coelho A, et al. Cervical cancer and *CYP2E1* polymorphisms: implications for molecular epidemiology. *Eur Clin Pharmacol.* 2006;62:15-21.

Francis DA, Schmid SI, Howley PM. Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cell. *J Virol.* 2000;74(6):2679-86.

Franco E, Villa L, Rohan T, Ferenczy A, Petzl-Erler M, Matlashewski G, et al. Design and methods of Ludwig-McGill longitudinal study of the natural history of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. *Rev Panam Salud Publica.* 1999;6(4):223-33.

Frova C. Glutathione transferase in genomics era: news insights and perspectives. *Biomol Eng.* 2006;23:149-69.

Furihata M, Takeuchi T, Matsumoto M, Kurabayashi A, Ohtsuki Y, Terao N, et al. P53 mutation arising in Arg72 allele in the tumorigenesis and development of carcinoma of the urinary tract. *Clin Cancer Res.* 2002;8:1192-5.

Garcia-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, et al. *NAT2* slow acetylation and *GSTM1* null genotypes increase bladder cancer risk: results from the Spanish bladder cancer study and meta-analysis. *Lancet.* 2005;366(9486):649-59.

Geisler SA, Olshan AF. *GSTM1*, *GSTT1*, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2001;154(2):95-105.

Gemmati D, Ongaro A, Scapoli GL, Della Porta M, Tognazzo S, Serino ML, et al. Common gene polymorphisms in the metabolic folate and methylation pathway and the risk of acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(5):787-94.

---

- 
- Genther SM, Sterling S, Duensing S, Münger K, Sattler C, Lambert PF. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *J Virol.* 2003;77(5):2832-42.
- Gibbs JR, Singleton A. Application of genome-wide single nucleotide polymorphism typing simple association and beyond. *PLoS Genetics.* 2006;2(10):1511-7.
- Goodman JE, Mechanic LE, Luke BT, Ambs S, Chanock S, Harris CC. Exploring SNP-SNP interactions and colon cancer risk using polymorphism interaction analysis. *Int J Cancer* 2006;118(7):1790-7.
- Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, Bertram CC, Wilkens LR, Guo C, et al. *CYP1A1*, *GSTM1*, and *GSTT1*, polymorphisms and risk of cervical squamous intraepithelial lesions in a multiethnic population. *Gynecol Oncol.* 2001;81:263-9.
- Gudleviciene Z, Didzipetriene J, Ramael M, Uleckiene S, Valuskas KP. Human papillomavirus and p53 polymorphism in Lithuanian cervical cancer patients. *Gynecol Oncol.* 2006;102:530-3.
- Guo Z, Pontén F, Wilander E, Pontén J. Clonality of precursors of cervical cancer and their genetical links to invasive cancer. *Mod Pathol.* 2000;13(6):606-13.
- Gustafsson AC, Guo Z, Hu X, Ahmadian A, Brodin B, Nilsson A, et al. HPV-related cancer susceptibility and p53 codon 72 polymorphism. *Acta Derm Venerol.* 2001;81:125-9.
- Habdous M, Siest G, Herbeth B, Vincent-Viry M, Visvikis S. Polymorphismes des glutathion S-transferases et pathologies humaines: bilan des études épidémiologiques. *Ann Biol Clin.* 2004;62:15-24.
- Harris N, Brill E, Shohat O, Prokomecimer M, Wolf D, Arai N, et al. Molecular basis for heterogeneity of human p53 protein. *Mol Cell Biol.* 1986;6(12):4650-6.
- Hart RW, Dixit R, Seng J, Turturro A, Leakey JEA, Feuers R, et al. Adaptive role of caloric intake on the degenerative disease process. *Toxicol Sci.* 1999;52 Suppl: 3-12.
- Haupt S, Berge M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis – the p53 network. *J Cell Sci.* 2003;116:4077-85.
- Haverkos H, Rohrer M, Pickworth W. The cause of invasive cervical cancer could be multifactorial. *Biomed Pharmacoter.* 2000;54:54-9.
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione Transferase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:51-88.
-

- 
- Hayes VM, Hofstra RM, Buys CH, Hollema H, Van der Zee AG. Homozygous arginina-72 in wild type p53 and risk of cervical cancer. *Lancet*. 1998;352:1756.
- Helland Å, Langerød A, Johnsen H, Olsen AO, Skovlund E, Børresen-Dale AL. P53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature*. 1998;396(6711):530-1.
- Hengster JG, Kett A, Arand M, Oesch-Bartlomowicz B, Oesch F, Pilch H, et al. Glutathione S-transferase T1 and M1 gene defects in ovarian carcinoma. *Cancer Lett*. 1998;130:43-8.
- Herbert A, Singh N, Smith JA. Adenocarcinoma of the uterine cervix compared with squamous cell carcinoma: a 12-year study in Southampton and South-west Hampshire. *Cytopathology*. 2001;12:26-36.
- Hesket R. P53. In: Hesket R. *The oncogene facts book*. San Diego: Academic Press; 1995. p.313-22.
- Hildesheim A, Schiffman M, Brinton L, Fraumeni JF Jr, Herrero R, Bratti MC. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature*. 1998;396(6711):531-2.
- Hines RN, McCarver DG. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase I oxidative enzymes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;300(2):355-360.
- Hopkins MP, Morley GW. A comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol*. 1991;77:912-7.
- Howells RE, Holland T, Dhar KK, Redman CWE, Hand P, Hoban PR, et al. Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 genotypes in ovarian cancer: association with p53 expression and survival. *Int J Gynecol Cancer*. 2001;11:107-12.
- Huang K, Sandler RS, Millikan RC, Schroeder JC, North KE, Hu Jennifer. *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms, cigarette smoking, and risk of colon cancer: a population-based case-control study in North Carolina (United States). *Cancer Causes Control*. 2006;17:385-94.
- Hung RJ, Hall J, Brennan, Boffetta P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2005;162(10):925-42.
- Ioannidis JPA, Trikalinos TA, Ntzani EE, Contopoulos-Ioannidis DG. Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment. *Lancet*. 2003;361:567-71.
- Ingelman-Sundberg M. Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. *Toxicology*. 2002;181-182:447-52.
- Ishikawa H, Nakanishi T, Inoue T, Kuzuya K. prognostic factor of adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 1999;73:42-6.
-

Jacobs EJ, Feigelson HS, Bain EB, Brady KA, Rodriguez C, Stevens VL, et al. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and breast cancer in Cancer Prevention Study II cohort. *Breast Cancer Res* [serial on the internet]. 2006 [cited 2006 Apr 13];8(2):[about 6]. Available from: <http://breast-cancer-research.com/content/8/2/R22>.

Jee SH, Lee JE, Park JS. Polymorphism of codon 72 of p53 and environmental factors in the development of cervical cancer. *Int J Gynecol Obstet*. 2003;80:69-70.

Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, McCauley RD, Hall JC. Glutathione. *ANZ J Surg*. 2003;73:517-22.

Joseph T, Chacko P, Wesley R, Jayaprakash PG, James FV, Pillai MR. Germline genetic polymorphisms of *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* genes in Indian cervical cancer: association with tumor progression, age and human papillomavirus infection. *Gynecol Oncol*. 2006;101:411-7.

Josephsson AM, Magnusson PKE, Ylitalo N, Quaforth-Tubbin P, Pontén J, Adami HO, et al. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature*. 1998;396(6711):531.

Kawagushi H, Ohno S, Araki K, Miyazaki M, Saeki H, Watanabe M, et al. P53 polymorphism in human papillomavirus – associated esophageal cancer. *Cancer Res*. 2000;60:2753-5.

Kim JW, Lee CG, Park YG, Kim KS, Kim IK, Sohn YW, et al. Combined analysis of germline polymorphisms of p53, *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1* and *CYP2E1*. *Cancer*. 2000;88:2082-91.

Klug S, Wilmotte R, Santos C, Almonte M, Herrero R, Guerrero I. TP53 polymorphism, HPV infection, and risk of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10:1009-12.

Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, Knudsen ES. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene* 2006;25:1620-8.

Komiya Y, Tsukino H, Nakao H, Kuroda Y, Imai H, Katoh T. Human glutathione S-transferase A1, T1, M1 and P1 polymorphisms and susceptibility to prostate cancer in the Japanese population. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005;131:238-42.

Koushik A, Platt RW, Franco EL. P53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13:11-22.

Koushik A, Ghosh A, Duarte-Franco E, Forest P, Voyer H, Matlashewski G, et al. The p53 codon 72 polymorphism and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Detect Prev*. 2005;29:307-16.

---

---

Krude T. Initiation of chromosomal DNA replication in mammalian cell-free systems. *Cell Cycle*. 2006;5(18):2115-22.

Lai R, Crevier L, Thabane L. genetics polymorphisms of glutathione s-transferase and the risk of adult brain tumors: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(7):1784-90.

Lang NP. Molecular epidemiology: New insights into diagnosis and prognosis. *J Surg Oncol*. 2004;85:4-6.

Lea JS, Sheets EE, Wenham RM, Duska LR, Coleman RL, Miller DS, et al. Stage IIB-IVB cervical adenocarcinoma: prognostic factors and survival. *Gynecol Oncol*. 2002;84:115-9.

Lecomte T, Landi B, Beaune P, Laurent-Puig P, Lorient M-A. Glutathione S-transferase P1 polymorphism (ile<sup>105</sup>val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2006;12(10):3050-6.

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

Li D, Frazier M, Evans DB, Hess KR, Crane CH, Jiao L, et al. Single nucleotide polymorphisms of *RecQ1*, *RAD54L* and *ATM* genes are associated with reduced survival of pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(11):1720-8.

Liu G, Miller DP, Zhou W, Thurston SW, Fan R, Xu LL, et al. Differential association of the codon 72 *p53* and *GSTM1* polymorphisms on histological subtype of non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res*. 2001;61:8718-22.

Lourenço GJ, Ortega MM, Nascimento H, Teori MT, De Souza CA, Costa FF, et al. Polymorphisms of glutathione S-transferase mu1(*GSTM1*) and theta1 (*GSTT1*) genes in chronic myeloid leukaemia. *Eur J Haematol*. 2005;75:530-1.

Lüchtenborg M, Weijenberg MP, Kampman E, Van Muijen GN, Roemen GM, Zeegers MPA, cigarette smoking and colorectal cancer: *APC* mutations, hMLH1 expression, and *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms. *Am J Epidemiol*. 2005;161:806-15.

MacAuley A, Ladiges WC. approaches to determine clinical significance of genetic variants. *Mutat Res*. 2005;573:205-20.

Madaleine MM, Shera K, Schwartz SM, Daling JR, Galloway DA, Wipf GC, et al. The p53 Arg72Pro polymorphism, human papillomavirus, and invasive squamous cell cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9:225-7.

Malcolm EK, Baber GB, Boyd JC, Stoler MH. Polymorphism at codon 72 is not associated with cervical cancer risk. *Mod Pathol*. 2000;13(4):373-8.

---

- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broke TR, Wolinsky SM. Use of polymerase amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*. 1989;7:209-14.
- Mantovani F, Banks L. The interaction between p53 and papillomaviruses. *Cancer Biol*. 1999;9:387-95.
- Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schineider J, Crawford LV. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol*. 1987;7(2):961-3.
- May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*. 1999;18:7621-36.
- McCarver DG, Hines RN. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase II conjugation enzymes and regulatory mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;300(2):361-6.
- McGrath M, Michaud D, De Vivo I. Polymorphisms in *GSTT1*, *GSTM1*, *NAT1* and *NAT2* genes and bladder cancer risk in men and women. *BMC Cancer* [serial on the internet]. 2006 [cited 2006 Oct 06];6(239):[about 8]. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1>
- McIlwain CC, Townsend DM, Tew KD. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene*. 2006;25:1639-48.
- Medeiros R, Soares R, Vasconcelos A, Schmitt F, Lopes C. Glutathione S-transferase genotype *GSTM1* as predictor of elevated angiogenic phenotype in patients with early onset breast cancer. *Angiogenesis*. 2004;7:53-8.
- Meisels A, Fortin R. Condylomatous Lesions of the cervix and vagina. I cytologic patterns. *Acta Cytol*. 1976;20:505-9.
- Meisels A, Fortin R, Roy M. Condylomatous lesions of cervix. II cytologic, colposcopic and histopathologic study. *Acta Cytol*. 1977;21:379-90.
- Miller DP, Liu G, De Vivo I, Lynch TJ, Wain JC, Su L, et al. Combinations of the variant genotypes of *GSTP1*, *GSTM1*, and *p53* are associated with an increased lung cancer risk. *Cancer Res*. 2002;62:2819-23.
- Minaguchi T, Kanamori Y, Matsushima M, Yoshikawa H, Taketani Y, Nakamura Y. No evidence of correlation between polymorphism at codon 72 of p53 and risk of cervical cancer in Japanese patients with human papillomavirus 16/18 infection. *Cancer Res*. 1998;58:4585-86.
- Mitrunen K, Jourenka N, Kataja V, Eskelinen M, Kosma V-M, Benhamou S, et al. Glutathione S-transferase *M1*, *M3*, *P1*, and *T1* genetic polymorphisms and Susceptibility to breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10:229-36.
-

- 
- Moisio AL, Sistonen P, Mecklin JP, Järvinen H, Peltomäki P. Genetic polymorphisms in carcinogen metabolism and their association to hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology*. 1998;115:1387-94.
- Morgan K, Lam L, Kalsheker N. A rapid and efficient method for DNA extraction from paraffin wax embedded tissue for PCR amplification. *J Clin Pathol Mol Pathol*. 1996;49:M179-80.
- Motoyama S, Ladines-Llave CA, Villanueva SL, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci*. 2004;50(1):9-19.
- Moura Gallo CV, Mendonça GAS, Moraes E, Olivier M, Hainaut P. *TP53* mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives. *Mutat Res*. 2005;589:192-207.
- Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol*. 2000;19:1-5.
- Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revised. *Cell*. 2004;116:221-34.
- Nagarsheth NP, Maxwell GL, Bentley RC, Rodriguez G. Bilateral pelvic lymph node metastases in a case of FIGO stage IA, adenocarcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol*. 2000;77:467-70.
- Nagpal JK, Sahni S, Das BR. P53 codon 72 polymorphism and susceptibility to development of human papilloma virus-associated cervical cancer in Indian women. *Eur J Clin Invest*. 2002;32:943-8.
- Nakamura S, Gomyo Y, Roth JA, Mukhopadhyay T. C-terminus of p53 is required for G2 arrest. *Oncogene*. 2002;21:2102-7.
- Nakanishi T, Ishikawa H, Suzuki Y, Inoue T, Nakamura S, Kuzuya K. A comparison of prognoses of pathologic stage Ib adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 2000;79:289-93.
- Nakanishi T, Wakai K, Ishikawa H, Nawa A, Suzuki Y, Nakamura S, et al. A comparison of ovarian metastasis between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 2001;82:504-9.
- Newton-Cheh C, Hirchhorn JN. Genetic association studies of complex traits design and analysis issues. *Mutat Res*. 2005;573:54-69.
- Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2005;20(6):452-77.
- Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human phase I metabolizing enzymes except for cytochrome P450 and phase II metabolizing enzymes. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2006;21(5):357-74.
-

---

Ntais C, Polycarpou A, Ioannidis JPA. Association of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1*, gene polymorphisms with the risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(1):176-81.

Oakley AJ. Glutathione transferases: new functions. *Cur Opin Struct Biol*. 2005;15:716-23.

O'Connor DP, Kay EW, Leader M, Atkins GJ, Murphy GM, Mabruk MJ. P53 codon 72 polymorphism and human papillomavirus associated skin cancer. *J Clin Pathol*. 2001;54:539-42.

Okcu MF, Selvan M, Wang LE, Stout L, Erana R, Airewele G. Glutathione S-transferase polymorphisms and survival in primary malignant glioma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:2618-25.

Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat*. 2002;19(2):607-14.

Parl FF. Glutathione S-transferase genotype and cancer risk. *Cancer Lett*. 2005;221:123-9.

Pemble S, Schroeder K R, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, et al. Human glutathione S-transferase Theta (*GSTT1*): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J*. 1994;300:271-6.

Peters RK, Chao A, Mack TM, Thomas D, Bernstein L, Henderson BE. Increased frequency of adenocarcinoma of the uterine cervix in young women in Los Angeles County. *J Natl Cancer Inst*. 1986;76:423-8.

Pierce LM, Sivaraman L, Chang W, Lum A, Donlon T, Seifried A, et al. Relationship of *TP53* codon 72 and *HRAS1* Polymorphisms with lung cancer risk in an ethnically diverse population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9:1199-1204.

Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*. 2002;181-182:475-81.

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

Pinarbasi H, Silig Y, Gurelik M. genetic polymorphisms of GSTs and their association with primary brain tumor incidence. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;156:144-9.

Pirog EC, Kleter B, Olgac S, Bobkiewicz P, Lindeman J, Quint WG, et al. Prevalence of human papillomavirus DNA in difference histological subtype of cervical adenocarcinoma. *Am J Pathol*. 2000;157:1055-62.

---



- 
- Pollok S, Stoepel J, Bauerschmidt C, Kremmer E, Nasheuer HP. regulation of eukaryotic DNA replication at the initiation step. *Biochem Soc Trans.* 2003;31(Pt 1):266-9.
- Purola E, Savia E. Cytology gynecologic condiloma acuminatum. *Acta Cytol.* 1977;21:26-31.
- Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes *GSTM1* and *GSTT1* in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997;6:733-43.
- Rebbeck TR, Ambrosone CB, Bell DA, Chanock SJ, Hayes RB, Kadlubar FF, et al. SNPs, haplotypes, and cancer: applications in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(5):681-7
- Recoules-Arche A, Rouzier R, Rey A, Villefranche V, Haie-Meder C, Pautier P, et al. Les adenocarcinomas du col utérin ont-ils plus mauvais pronostic que les carcinomas épidermoïdes? *Gynecol Obstet Fertil.* 2004;32:116-21.
- Rezza G, Giuliani M, Garbuglia AR, Serraino D, Cappiello G, Migliore G, et al. Lack of association between p53 codon-72 polymorphism and squamous intraepithelial lesions in women with, or at risk for, human immunodeficiency virus and/or human papillomavirus infections. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10:565-6.
- Romero R, Kuivaniemi H, Tromp G, Olson JM. The design, execution, interpretation of genetic association studies to decipher complex diseases. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187:1299-312.
- Roodi N, Dupont WD, Moore JH, Parl FF. Association of homozygous wild-type glutathione S-transferase M1 genotype with increased breast cancer risk. *Cancer Res.* 2004;64:1233-6.
- Rosenthal AN, Ryan A, Al-Jehani RM, Storey A, Harwood CA, Jacobs IJ. P53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK. *Lancet.* 1998;352:871-5.
- Rothman N, Wacholder S, Caporaso NE, Garcia-Closas M, Buetow K, Fraumeni JF Jr. The use of common genetic polymorphisms to enhance the epidemiologic study of environmental carcinogens. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1471:C1-C10.
- Sánchez I, Dynlacht BD. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Develop Biol.* 2005;16:311-21.
- Sansbury LB, Bergen AW, Wankle KL, Yu B, Caporaso NE, Chatterjee N, et al. Inflammatory cytokine gene polymorphisms, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk of adenoma polyp recurrence in the polyp prevention trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(3):494-501.
-

---

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

Sasiene P, Adams J. Changing rates of adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the cervix in England. *Lancet.* 2001;357:1490-3.

Schiffman MH, Castle P. Epidemiologic studies of a necessary causal risk factor: human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(6):E2. Comment on: *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(12):958-64.

Sharma A, Sharma JK, Murthy NS, Mitra AB. Polymorphisms at *GSTM1* and *GSTT1* gene loci and susceptibility to cervical cancer in Indian population. *Neoplasma.* 2004;51(1):12-6.

Sheweita SA, Tilmisany AK. Cancer and phase II drug-metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab.* 2003;4:45-58.

Shimada T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006;21(4):257-76.

Siddique MM, Balram C, Fiser-Maliszewska L, Aggarwal A, Tan A, Tan P, et al. Evidence for selective expression of the p53 codon 72 polymorphisms: implications in cancer development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(9):2245-52.

Smith HO, Tiffany MF, Qualls CR, Key CR. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States—a 21-year population-based study. *Gynecol Oncol.* 2000;78:97-105.

Sobti RC, Kaur S, Kaur P, Singh J, Gupta I, Jain V, et al. Interactions of passive with *GST* (*GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1*) genotypes in the risk of cervical cancer in India. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006;166:117-23.

Soulitzis N, Sourvinos G, Dokiniakis DN, Spandidos DA. P53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Lett.* 2002;179:175-83.

Sprenger R, Schlagenhauer R, Kerb R, Bruhn, Brockmüller J, Roots I, et al. Characterization of the glutathione S-transferase *GSTT1* deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. *Pharmacogenetics.* 2000; 10:557-65.

Spurdle AB, Webb PM, Purdie DM, Chen X, Green A, Chenevix-Trench G. Polymorphisms at the glutathione S-transferase *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* loci: risk of ovarian cancer by histological subtype. *Carcinogenesis.* 2001;22(1):67-72.

---

- Sreeja L, Symala V, Hariharan S, Madhavan J, Devan CS, Ankathil R. Possible risk modification by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 gene polymorphisms in lung cancer susceptibility in a South Indian population. *J Hum Genet* 2005;50:618-27.
- Srivastava DS, Mishra DK, Mandhani A, Mittal B, Kumar A, Mittal RD. Association of genetic polymorphism of glutathione S-transferase M1, T1, P1 and susceptibility to bladder cancer. *Eur Urol.* 2005;48:339-44.
- Stevenson M, Hudson LC, Burns JE, Stewart RL, Wells M, Maitland NJ. Inverse relationship between the expression of the human papillomavirus type 16 transcription factor E2 and virus DNA copy number during the progression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol.* 2000;81:1825-32.
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature.* 1998;393:229-34.
- Strange RC, Lear JT, Fryer AA. Glutathione S-transferase polymorphisms: influence on susceptibility to cancer. *Chem Biol Interact.* 1998;111-112:351-64.
- Suh Y, Vijg J. SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes. *Mutat Res.* 2005;573:41-53.
- Sul J, Yu GP, Lu QY, Lu ML, Setiawan VW, Wang M-R, et al. P53 codon 72 polymorphisms: a case control study of gastric cancer and potential interactions. *Cancer Lett.* 2006;238:210-23.
- Taioli E, Pedotti P, Garte S. Importance of allele frequency estimates in epidemiological studies. *Mutat Res.* 2004;567:63-70.
- Takanashi M, Morimoto A, Yagi T, Kuriyama K, Kano G, Imamura T, et al. Impact of glutathione S-transferase gene deletion on early relapse in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2003;88:1238-44.
- Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM. The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV negative cells. *J Bio Chem.* 1998;273(11):6439-45.
- Tenti P, Vesentini N, Spauldo MR, Zappatore R, Migliora P, Carnevali L, et al. P53 codon 72 polymorphism does not affect the risk of cervical cancer in patients from Northern Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:435-8.
- Thorland EC, Myers SL, Persing DH, Sarkar G, McGovern BS, Smith DI. Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res.* 2000;60:5916-21.
- Tjalma WA, Van Waes TR, Van den Eeden LEM, Bogers JJ. Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2005;19(4):469-83.
-

- Tommasino M, Accardi R, Caldeira S, Dong W, Malanchi I, Smet A, et al. The role of TP53 in cervical carcinogenesis. *Hum Mutat.* 2003;21:307-12.
- Tommiska J, Eerola H, Heinonen M, Salonen M, Kaare M, et al. Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival. *Clin Cancer Res.* 2005;11(14):5098-13.
- Tornesello ML, Waddell KM, Duraturo ML, Biryahwaho B, Downing R, Lucas SB, et al. TP53 codon 72 polymorphism and risk of conjunctival squamous cell carcinoma in Uganda. *Cancer Detect Prev.* 2005;29:501-8.
- Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anticancer drug resistance. *Oncogene.* 2003;22:7369-75.
- Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine.* 2006;24 Suppl 1:S1-15.
- Tsabouri S, Georgiou I, Katsaraki A, Bourantas KL. Glutathione sulfur transferase M1 and T1 genotypes in chronic lymphoblastic leukemia. *Hematol J.* 2004;5:500-4.
- Tsai MH, Lin CD, Hsieh YY, Chang FC, Tsai FJ, Chen WC, et al. Prognostic significance of the praline form of p53 codon 72 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope.* 2002;112:116-9.
- Ueda M, Hung YC, Terai Y, Kanda K, Takehara M, Yamashita H, et al. Glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and p53 codon 72 polymorphisms in human tumor cells. *Hum Cell.* 2003;16(4):241-51.
- Ueda M, Hung YC, Terai Y, Saito J, Nunobiki O, Noda S, et al. Glutathione-S-transferase and p53 polymorphisms in cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol.* 2005;96:736-40.
- Ueda M, Terai Y, Kanda K, Kanemura M, Takehara M, Yamaguchi H, et al. Germline polymorphism of p53 codon 72 in gynecological cancer. *Gynecol Oncol.* 2006;100:173-8.
- Van Duin M, Snijders PJ, Vossen MT, Klaassen E, Voorhorst F, Verheijen RH, et al. Analysis of human papillomavirus type 16E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J Gen Virol.* 2000;81:317-25.
- Vermeulen K, Breneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle apoptosis. *Cell Prolif.* 2003;36:165-75.
- Villa LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Cancer Res.* 1997;71:321-41.
- Vogelstein B, Kinzler KW. P53 function and dysfunction. *Cell.* 1992;70:523-6.
-

- Vogl FD, Taioli E, Maugard C, Zheng W, Pinto LF, Ambrosome C, et al. Glutathione s-transferase M1, T1, and P1 and breast cancer: a pooled analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(9):1473-9.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189:12-19.
- Wang YC, Chen CY, Chen SK, Chang YY, Lin P. P53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: association with lung cancer susceptibility and prognosis. *Clin Cancer Res*. 1999;5:129-34.
- Weinberg WC, Denning MF. P21<sup>WAF1</sup> control of epithelial cell cycle and cell fate. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(6):453-64.
- Wrensch M, Kelsey KT, Liu M, Miike R, Moghadassi M, Aldape K. Glutathione S-transferase variants and adult glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(3):461-7.
- Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 proteins: form, function and features. *Virus Genes*. 2002;24(3):275-290.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2004;14:473-86.
- Xu C, Li CY, Kong AN. Induction of phase I, II and III drug metabolism / transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res*. 2005;28(3):249-68.
- Xu Sj, Wang Y, Roe B, Pearson WR. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and *GSTM1* deletion. *J Biol Chem*. 1998;273(6):3517-27.
- Yamashita T, Yaginuma Y, Saitoh Y, Kawai K, Kurakane T, Hayashi H, et al. codon 72 polymorphism of p53 as a risk factor for patients with human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions and invasive cancer of the uterine cervix. *Carcinogenesis*. 1999;20(9):1733-6.
- Yang YC, Chang CL, Chen ML. Effect of p53 polymorphism on the susceptibility of cervical cancer. *Gynecol Obstet Invest*. 2001;51:197-201.
- Ye Z, Song H, Higgins JTP, Pharoah P, Danesh J. Five glutathione S-transferase gene variants in 23,452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies. *PLoS Med*. 2006;3(4):0524-34.
- Yu MW, Yang SY, Chiu YH, Chiang YC, Liaw YF, Chen CJ. A p53 genetic polymorphism as a modulator of hepatocellular carcinoma risk in relation to chronic liver disease, familial tendency, and cigarette smoking in hepatitis B carriers. *Hepatology*. 1999;29:697-702.
- Zaino RJ. Glandular lesions of the uterine cervix. *Mod Pathol*. 2000;13:261-74.
-

- Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Genta F, Tommasino M. Codon 72 polymorphism of p53 and its association with cervical cancer. *Lancet*. 1999;354:218-9.
- Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, et al. p53 codon polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. *Cancer Res*. 2001;61:608-11.
- Zheng T, Holford RT, Ma Z, Chen Y, Liu W, Ward B, et al. The continuing increase in adenocarcinoma of the uterine cervix: a birth cohort phenomenon. *Int J Epidemiol*. 1996;25(2):252-8.
- Zheng W, Gao YT, Shu XO, Wen W, Cai Q, Dai Q, et al. Population-based case-control study of *CYP11A* gene polymorphism and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(5):709-14.
- Zhong S, Spurr NK, Hayes JD, Wolf CR. Deduced amino acid sequence, gene structure and chromosomal location of a novel human class Mu glutathione S-transferase, GSTM4. *Biochem J*. 1993;291:41-50.
- Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 2000;408:433-9.
- Zhu ZZ, Cong WM, Liu SF, Dong H, Zhu G-S, Wu MC. Homozygosity for Pro of p53 Arg72Pro as a potential risk factor for hepatocellular carcinoma in Chinese population. *World J Gastroenterol*. 2005;11(2):289-92.
- zur Hausen H. Viruses in human cancer. *Science* 1991;254:1167-72.
-

## Abstract

**Purpose:** To analyze the codon 72 p53 protein and the metabolizing enzymes GSTM1 and GSTT1 families' polymorphisms in the uterine cervix adenocarcinoma carcinogenesis. **Methods:** This case-control study concerned 43 adenocarcinoma samples from formalin-fixed and paraffin- embedded tissues belonging study group and 86 endocervical cell samples, collected by cytobrush, from women without cervical tumor belonged to the control group. Demonstration of HPV presence, p53 polymorphisms, the GSTM1 enzyme and its null allele (GSTM1\*0), the GSTT1 enzyme and its null allele (GSTT1\*0) were performed using the polymerase chain reaction. **Results:** The study group mean age was 52.49 years and in the control group was 48.07 years. The groups were homogeneous by the t Student test ( $p=0.1042$ ) (95% CI). The HPV was present in 42(97.67%) cases from study group and in 27(31.40%) from the control group and the  $\chi^2$  test was significant ( $p=0.001$ ) (95% CI), the odds ratio was 113.79 (95% CI: 13.671; 947.145) ( $p<0,001$ ). The p53 isoforms analysis by the Fisher exact test of the two groups wasn't significant  $p = 0.397$ (95% CI). The analysis of HPV and p53 alleles association in the two groups by Fisher exact test was  $p=0,653$  (95% CI). The GSTM1 and GSTM1\*0 analysis in the two groups didn't show difference by the  $\chi^2$  test was  $p= 0.374$  (CI = 95%). The GSTM1 and GSTM1\*0 associations with HPV and p53 isoforms by Fisher exact test weren't significant  $p=0.256$  (95% CI) and  $p = 1.000$  (95% CI) respectively. The GSTT1 and GSTT1\*0 analysis by the  $\chi^2$  test was  $p= 0.001$  (95% CI) and the odds ratio was 4.58 (95% CI: 2.04; 10.28) ( $p<0,001$ ). The GSTT1 and GSTT1\*0 associations with HPV by Fisher exact test was  $p<0.001$ (95% CI). The GSTT1\*0 odds ratio was 6.67(95% CI: 1.99; 22.17) ( $p<0.001$ ). The GSTT1 odds ratio was 0.15 (95% CI: 0.045; 0.502) ( $p<0.0021$ ). The association of GSTT1 and GSTT1\*0 with p53 by Fisher exact test wasn't significant  $p=0.056$  (95% CI). The GSTM1 and GSTT1 families' association analysis by a regression logistic model shows that the GSTM1 family wasn't a prognostic factor in cervical adenocarcinoma either alone or with GSTT1 family. **Conclusions:** HPV was present in 97.67% of the adenocarcinomas. The HPV status showed a risk of 113.79 times for adenocarcinoma carcinogenesis. GSTT1\*0 showed a risk for adenocarcinoma of 4.6 times, and in its association with HPV increased the risk in acquiring uterine cervix adenocarcinoma to 6.67 times. The presence of GSTT1 offered protection against adenocarcinoma carcinogenesis. The p53 isoforms and the GSTM1 family didn't share the adenocarcinoma carcinogenesis in this studied population.

## **Bibliografia Consultada**

Anjos M, Ferreira MB, coordenadores e editores. Aurélio Século XXI: o dicionário da língua portuguesa. 3ª ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 1999. 2128 p.

Dicionário Médico Ilustrado Dorland. Traduzido por Oliveira NG. 28ª ed. São Paulo: Manole; 1999. 2217 p.

Michaelis: moderno dicionário inglês-português, português-inglês. São Paulo: Melhoramentos; 2000. 1735 p.

Rosner B. Fundamentals of biostatistics. 2ª ed. Boston: PWS; 1986. 584 p.

Rother ET, Braga ME. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2ª ed. rev. e amp. São Paulo; 2005. 122 p.

Saramago J. As pequenas memórias. São Paulo: Companhia das Letras; 2006. 138 p.

Singleton P, Sainsbury D. Dictionary of microbiology and molecular biology. 2<sup>nd</sup> ed. Chichester: Wiley – Interscience; 1987. 1019 p.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)