

Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular



**POLIMORFISMOS NOS GENES TP53, 53BP1 E ATM:
SUSCEPTIBILIDADE PARA CANCRO DO COLO DO ÚTERO**

Dissertação de Mestrado da licenciada

SARA RAQUEL DA SILVA OLIVEIRA

Porto 2007



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

**POLIMORFISMOS NOS GENES *TP53*, *53BP1* E *ATM*:
SUSCEPTIBILIDADE PARA CANCRO DO COLO DO
ÚTERO**

Orientação: Professor Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo da Silva

Co-orientação: Hugo Manuel Lopes Sousa

SARA RAQUEL DA SILVA OLIVEIRA

Porto, 2007

INFORMAÇÃO TÉCNICA

TÍTULO:

Polimorfismos nos genes *TP53*, *53BP1* e *ATM*.

Susceptibilidade para cancro do colo do útero

Dissertação de Tese de Mestrado em Medicina e oncologia Molecular

AUTOR:

Sara Raquel da Silva Oliveira

Todos os direitos reservados.

Sara RS Oliveira

Rua Alfredo Bastos, 270

Vila do Conde

4480-724 Vila do Conde

Portugal

E-mail: sararoliveira@gmail.com

1ª Edição, Outubro 2007

**DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE MESTRE
APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DO PORTO**

AGRADECIMENTOS

Quero expressar os meus sinceros agradecimentos ao Professor Doutor Rui Medeiros, pela orientação neste trabalho. O meu sincero obrigada pelo conhecimento e motivação que me transmitiu e pela confiança que depositou em mim.

Ao Professor Doutor Carlos Lopes que disponibilizou todos os meios necessários ao grupo de Patologia e Oncologia Molecular, fundamentais para a concretização deste projecto.

Ao Professor Doutor Manuel Sobrinho Simões, pelo empenho que sempre dedicou ao Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular.

A toda a equipa do laboratório de Patologia e Oncologia Molecular.

À Inês e à Dulce, pela alegria que deixaram no laboratório. À Carla pela boa disposição da qual já sinto saudade. À Regininha, pelo companheirismo e simpatia, pelos muitos bons momentos que passamos. Adorei ter-te conhecido!

Quero agradecer especialmente...

.... À Daniela, pela amizade, pelo apoio, profissionalismo e responsabilidade que me transmitiu. Obrigada por tudo que me ensinaste. Serás sempre a minha "chefinha" preferida.

Ao Hugo, o meu “chefinho” que tanto me ensinou. Pelo teu apoio, paciência e estímulo constantes e pela tua amizade... o meu sincero obrigada! És sem dúvida um exemplo de que quando se trabalha, tudo se consegue! Aprendi muito contigo!

À Ana Luísa, por todos os momentos que passamos ao longo destes 2 anos. Pelas muitas gargalhadas que soltamos e até pelas lágrimas que choramos. Estiveste sempre comigo quando eu precisei. E disso, nunca me vou esquecer! Obrigada pela tua amizade e pelo teu apoio!

Tenho obrigatoriamente de agradecer aos meus pais, os quais sempre acreditaram que eu iria conseguir. Por tudo o que vos devo... vida, educação, apoio e carinho, por se esforçarem inesgotavelmente que a minha vida seja cada melhor... Obrigada!

À Lisa, à Sónia e à Su, que muitas vezes ouviram: “Hoje não posso, tenho a minha tese para escrever” Obrigada por estarem sempre comigo. Adoro-vos!

Ao Berto, por todo o apoio e dedicação. Obrigada por existires e por me fazeres sentir especial...

ÍNDICE

	Pág.
RESUMO	IX
SUMMARY	XII
I_INTRODUÇÃO	1
1. CANCRO	2
2. VÍRUS E CANCRO	5
- Polimorfismos genéticos	6
2.1. CANCRO DO COLO DO ÚTERO	6
2.2. VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV)	8
2.2.1. Estrutura do virião e organização do genoma	9
2.2.2. Ciclo de vida de um HPV	11
2.2.3. Transformação celular	13
3. REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR E CANCRO	15
3.1. CICLO CELULAR	15
3.2. PONTOS DE CONTROLO DO CICLO CELULAR	16
3.3. GENES ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DO CONTROLO DO CICLO CELULAR ...	18
3.3.1. Gene <i>TP53</i> , Ciclo Celular e Cancro	18
- Polimorfismos no gene <i>TP53</i>	20
3.3.2. Gene <i>53BP1</i> , Ciclo Celular e Cancro	21
- Polimorfismos no gene <i>53BP1</i>	23
3.3.3. Gene <i>ATM</i> , Ciclo Celular e Cancro	24
- Polimorfismos no gene <i>ATM</i>	27

II_ OBJECTIVOS	28
III_ MATERIAL E MÉTODOS.....	30
1. POPULAÇÃO/PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	31
2. EXTRACÇÃO DO DNA	31
3. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS	32
3.1. AMPLIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO R72P NA P53	32
3.1.1. Método AS-PCR	33
3.1.2 Método <i>Real Time</i> PCR	34
3.2. AMPLIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO C1236G NO GENE <i>53BP1</i>	35
3.3. AMPLIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO G5557 NO GENE <i>ATM</i>	38
4. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
IV_ RESULTADOS	40
1. ANÁLISE DO POLIMORFISMO R72P NA P53	41
2. ANÁLISE DO POLIMORFISMO C1236G NO GENE <i>53BP1</i>	45
3. ANÁLISE DO POLIMORFISMO G5557A NO GENE <i>ATM</i>	47
V_ DISCUSSÃO	51
VI_ CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	58
VII_ REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

RESUMO



O ciclo celular de uma célula prossegue, normalmente, sem que hajam interrupções. Contudo, quando ocorrem danos no DNA, nomeadamente quebras da dupla hélice, as células têm a capacidade de parar transientemente a sua proliferação.

Como resposta a esta ameaça, as células eucariótas desenvolveram mecanismos que detectam a presença deste DNA danificado, permitindo assim, que na maioria das situações, este seja reparado. Esta resposta é mobilizada pela acção de uma proteína cinase, a pATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*). Após serem identificadas as zonas de DNA danificado, a pATM é então activada, indo fosforilar uma série de proteínas envolvidas no ciclo celular. Uma destas proteínas é a p53, a qual tem sido associada ao desenvolvimento de praticamente todos os tipos de neoplasias humanas. Outra proteína fundamental na resposta celular a quebras de dupla hélice do DNA é a p53BP1. Porém, o modo de actuação desta proteína no ciclo celular não foi ainda bem definido.

No presente trabalho realizou-se um estudo retrospectivo com um total de 700 amostras de raspagens cervico-vaginais provenientes de mulheres da região Norte de Portugal, com o intuito de se avaliar a influência dos polimorfismos genéticos nos genes *TP53*, *53BP1* e *ATM*, na susceptibilidade para cancro do colo do útero. Actualmente, sabe-se que para o desenvolvimento desta neoplasia, a infecção pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV) é um requisito necessário embora, não suficiente.

Quanto ao polimorfismo R72P na p53 não foram encontradas evidências de susceptibilidade aumentada quer para o desenvolvimento de lesões do colo do útero quer de carcinoma invasivo associado ao genótipo Arg/Arg ($p > 0.05$).

Relativamente ao polimorfismo C1236G no gene *53BP1*, verificou-se que a infecção por HPV16 aumenta o risco de progressão para HSIL em portadores do alelo C, contrariamente aos portadores do genótipo GG ($p = 0.00002$; OR=5.6 e $p = 0.299$ respectivamente).

Observou-se ainda uma influência do polimorfismo G5557A no gene *ATM* na idade para a qual ocorre progressão de lesões de baixo-grau (LSIL) para lesões de alto-grau (HSIL) e carcinoma invasivo. A idade mediana de aparecimento de lesões de alto-grau ou carcinoma invasivo (ICC) nos portadores do alelo A foi de 43.0 anos comparativamente com os 59.0 anos para os homozigóticos do alelo G ($p=0.001$).

Perante os resultados obtidos, podemos considerar o uso das raspagens cervico-vaginais para a análise molecular de factores de risco no desenvolvimento do cancro.

SUMMARY



Cell cycle progresses without interruptions. However, when DNA damage occurs, namely Double Strand Breaks (DSBs), cells are able to stop transiently their proliferation. In response to this threat, eucariotic cells develop mechanisms which detect this damage DNA. Thereby generally this DNA can be repaired. This response is carried out by the kinase protein, pATM.

Upon identification of the damage DNA, pATM is activated and fosforilates a set of proteins involved in cell cycle. One of these proteins is p53, which have been associated with the development of almost all type of human tumours. Other essential protein in cellular response to DSBs is p53BP1. However, the exactly mechanism of this protein in cell cycle remains controversial.

We developed a retrospective study considering a total of 700 cervical specimens of women from Northern region of Portugal, in order to evaluate the influence of genetic polymorphisms in *TP53*, *53BP1* and *ATM* genes in cervical cancer susceptibility. Actually is known that for the development of this neoplasia, the infection with human papillomavirus (HPV) is a necessary condition perhaps not sufficient.

Regarding the R72P polymorphisms in p53, no statistically significant differences were found. Therefore, at least in our population, the p53 R72P polymorphism is not associated with an increased susceptibility to squamous intraepithelial lesions or cervical cancer development ($p > 0.05$).

Analysing the C1236G polymorphism, we verify that the infection of HPV16 increases the risk of progression for HSIL in C carrier patients. Contrary, this effect in patients with GG genotype was not found ($p = 0.00002$; OR=5.6 e $p = 0.299$ respectively).

The *ATM* 5557A allele was found to influence the age at which the progression from LSIL to HSIL or ICC occurs. The median age of onset cancer in ATM A allele carriers was 43.0 years old comparing to 59.0 years old in G allele homozygous ($p = 0.001$).

Moreover, we may consider the use of exfoliated cervical cells for molecular analyses of genetic risk factors for cancer development.

INTRODUÇÃO



1. CANCRO

Com uma estimativa de aproximadamente 3.2 milhões de novos casos e 1.7 milhões de mortes contabilizadas em cada ano, o cancro tornou-se um importante problema de saúde pública na Europa (Ferlay *et al.*, 2006). Ao longo dos anos as condições ambientais e as características genéticas das populações têm sofrido fortes mudanças, contribuindo assim para uma alteração na epidemiologia do cancro.

De facto, os aumentos verificados na incidência e morte por cancro parecem estar associados à gradual transformação do estilo de vida, nomeadamente à recente exposição a carcinogéneos ambientais, quer sejam estes de natureza química, física ou biológica. Factores como o fumo do tabaco, a radiação ultra-violeta, a poluição, o consumo de álcool e a própria dieta alimentar têm, na verdade, sido identificados como agentes etiológicos do cancro (Capasso, 2004; Pinheiro *et al.*, 2003).

Sabe-se actualmente que o cancro é uma doença genética (Weber, 2002) e, como tal, desenvolve-se através da acumulação de mutações/alterações, num processo designado por carcinogénese. A carcinogénese inicia-se por uma ou mais mutações que ocorrem numa célula, dando a esta uma vantagem selectiva para se poder desenvolver perante condições de limitação de oxigénio, nutrientes e/ou factores de crescimento. O clone derivado vai então expandir-se e sucessivas alterações genéticas e epigenéticas ocorrem, fazendo com que o desenvolvimento uma neoplasia dependa não só da mutação inicial, mas sim de subseqüentes mutações que irão ocorrer (Michor *et al.*, 2004). Em cada etapa, apenas uma única célula sofre alteração, o que faz com que a evolução tumoral seja um processo monoclonal.

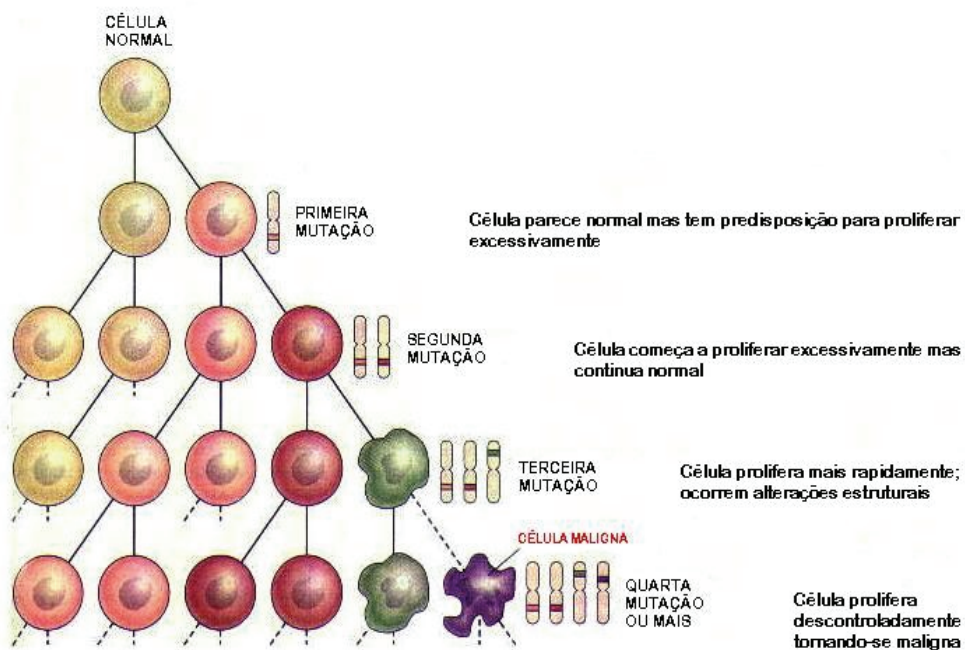


Figura 1 – Evolução clonal de uma neoplasia (<http://www.science.kennesaw.edu/>).

O número exacto de alterações que são necessárias para o desenvolvimento de um cancro é ainda desconhecido, no entanto pensa-se que o número varia com o tipo de alteração e o tipo de tumor (Hahn *et al.*, 1999).

A instabilidade genética promove o desenvolvimento tumoral ao aumentar a probabilidade de ocorrência de uma mutação e, de facto, parece que algum grau de instabilidade é necessário para a formação de determinada neoplasia. No mínimo, esta irá contribuir fortemente para a progressão da doença.

A literatura sugere que uma célula para ser considerada neoplásica tem de partilhar um conjunto de 6 características: Auto-suficiência aos sinais de crescimento; insensibilidade aos sinais inibitórios de crescimento; escape à morte celular programada; potencial replicativo ilimitado; capacidade de promover a angiogénese e capacidade de metastização (Hanahan e Weinberg, 2000).

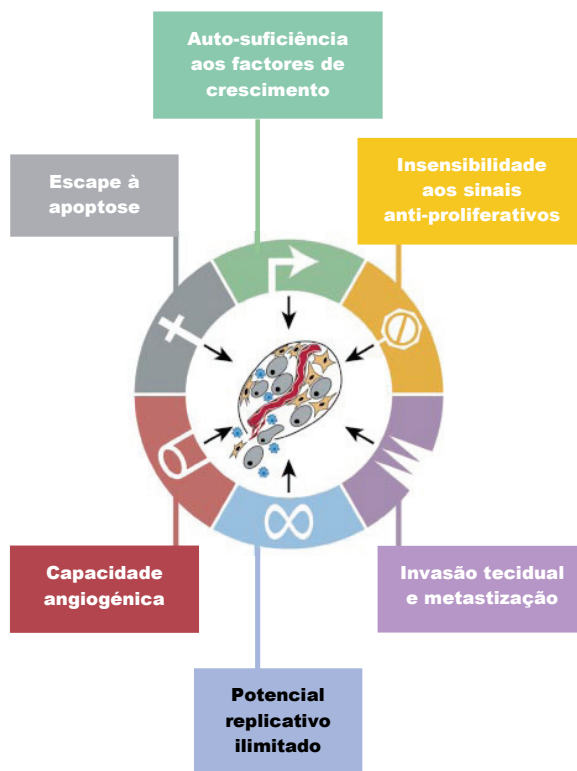


Figura 2 – Características de uma célula neoplásica (adaptado de Hanahan e Weinberg, 2000).

As células “parcialmente transformadas”, que acumulam somente algumas destas alterações necessárias para a malignidade, face às condições hostis encontradas vão portanto, acabar por morrer. Eventualmente, a célula que acumule o número suficiente de mutações de forma a exprimir todas estas funções irá então sobreviver e proliferar.

Actualmente pensa-se que para ser designada como tumoral, uma célula não necessita de reunir obrigatoriamente todas estas características. Na verdade, parece existir uma cooperação entre os diferentes tipos de células “parcialmente transformadas”, o que as torna capazes de se desenvolverem como massa tumoral maligna (Axelrod *et al.*, 2006).

2. VÍRUS E CANCRO

Embora o cancro não seja uma doença infecciosa, é certo que alguns tipos de cancros humanos desenvolvem-se por mecanismos que envolvem a participação de vírus. O papel exacto de um vírus no desenvolvimento de uma neoplasia é ainda difícil de compreender, uma vez que os vírus são responsáveis somente por algumas etapas na evolução de um dado tumor, sendo que factores ambientais e genéticos estão também envolvidos. Actualmente, pensa-se que os tumores associados a vírus constituam aproximadamente 16% da totalidade dos tumores em humanos, o que faz com que estes tenham uma contribuição significativa na carcinogénese humana (Butel, 2000; Carrillo-Infante *et al.*, 2007; Farrel, 2002).

Quadro I – Vírus associados a neoplasias humanas (adaptado de Farrel, 2002)

Vírus	Neoplasia associada
Vírus do Papiloma Humano	Cancro do colo do útero
Vírus da Hepatite B, C	Carcinoma hepatocelular
Vírus de Epstein-Barr	Linfoma de Burkitt Carcinoma da nasofaringe Cancro gástrico
Herpesvírus (Sarcoma de Kaposi)	Sarcoma de Kaposi
HTLV-1	Leucemia de células T
SV40	Mesotelioma

SV40, Vírus Simian 40; HTLV1, Vírus de leucemia humana de células T do tipo 1

- Polimorfismos Genéticos

Vários factores, já aqui referidos, têm sido identificados como possíveis agentes etiológicos do cancro. Os polimorfismos genéticos, quase na sua totalidade (90%) do tipo *Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)* (Brookes, 1999), foram já associados com susceptibilidade aumentada para o desenvolvimento de vários tipos de neoplasias humanas (Medeiros *et al.*, 2005). Estes consistem de alterações num único nucleotídeo e estão presentes em pelo menos 1% da população (Loktionov, 2004). Embora se considere que a grande maioria dos *SNPs* e outras variações comuns na sequência genómica humana não produza efeitos no fenótipo, pensa-se que uma parte delas seja responsável por quase todos os aspectos herdáveis da individualidade humana.

2.1. Cancro do Colo do Útero

Com uma estimativa de 495 000 novos casos diagnosticados em todo o mundo anualmente, o cancro do colo do útero constitui assim um grave problema de saúde pública (Ferlay *et al.*, 2004).

A sua taxa de mortalidade tem vindo a diminuir, provavelmente pela recorrência ao rastreio citológico através do teste de papanicolau que permite a detecção da doença em fase inicial (Ferlay *et al.*, 2004).

Em Portugal, a taxa de incidência ajustada à idade é ainda bastante elevada, sendo de 17/100 000 e a taxa de mortalidade de 5.9 por 100 000 indivíduos. São diagnosticados em Portugal cerca de 950 novos casos de cancro do colo do útero por ano, tornando-o, entre a Europa dos 15, o país com maior incidência desta neoplasia (Pinheiro *et al.*, 2003; Ferlay *et al.*, 2004).

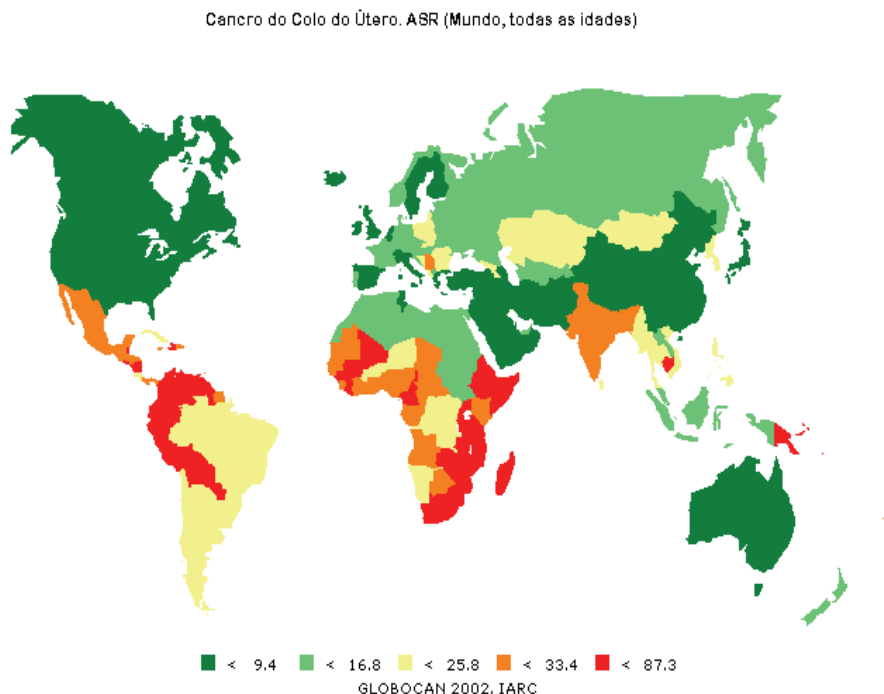


Figura 3 – Incidência Mundial do Cancro do Colo do Útero (adaptado de Ferlay *et al.*, 2004).

Estudos epidemiológicos e laboratoriais conduzidos nos últimos 20 anos, apresentaram o cancro do colo do útero como sendo uma doença multifactorial e de longa latência. Ao contrário da maioria das outras neoplasias, nas quais os factores ambientais, biológicos e o próprio estilo de vida contribuem fortemente para a carcinogénese, o cancro do colo do útero mostrou ter como principal agente causal, a infecção pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV). O HPV é desta forma um requisito necessário para o desenvolvimento desta neoplasia, porém não suficiente (Burd, 2003; Franco *et al.*, 1999). Na verdade, a contribuição do HPV para o risco de se desenvolver cancro do colo do útero é maior do que qualquer outro factor conhecido, nomeadamente a existência de múltiplos parceiros sexuais, a idade da primeira relação sexual, o uso

prolongado de contraceptivos orais, a dieta alimentar, fumo do tabaco e factores imunológicos e genéticos do hospedeiro (Bosh *et al.*, 1993; Franco *et al.*, 2001).

A grande maioria das infecções por HPV regride espontaneamente. Na verdade, só uma pequena porção destas lesões persiste e desenvolve o que se designa por lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL- *Low Grade Squamous Intraepithelial lesion*), uma leve displasia no terço inferior do epitélio. Quando não tratados, estes casos persistem e evoluem para uma displasia severa (HSIL- *High Grade Squamous Intraepithelial Lesion*) que atinge o terço superior do epitélio do colo uterino. Quando não há regressão, estas lesões progridem para carcinoma invasivo (ICC- *Invasive Cervical Cancer*), num processo que levará uma década ou mais. Nesta fase, as células neoplásicas invadem o estroma e rompem a membrana basal que separa o epitélio do tecido conectivo. Pensa-se que, na maioria dos casos, a transição de HSIL para ICC corresponde à integração do DNA viral no hospedeiro (Tommasino *et al.*, 2003; Furumoto e Irahara, 2002).

2.2. Vírus do Papiloma Humano

Os Papilomavírus (PV), pertencentes à família *papillomaviridae*, são um grupo heterogéneo de vírus de DNA já encontrados em várias espécies de vertebrados (Howley *et al.*, 2001). Até à data, mais de uma centena de papilomavírus capazes de infectar o Homem foram identificados e todos eles revelaram ser epiteliotrópicos (Zur Hausen, 2000). Infecções pelo vírus do papiloma humano foram já diagnosticadas em vários locais do corpo humano, como o tracto anogenital, uretra, pele, cavidade nasal, boca e esófago (de Villiers *et al.*, 2004).

2.2.1. Estrutura do virião e organização do genoma

O virião de um HPV tem uma estrutura icosaédrica composta por 72 capsômeros, contendo uma dupla cadeia de DNA circular fechado com um comprimento de aproximadamente 8000 pares de base (pb) (Arends *et al.*, 1998). Os viriões do HPV não possuem invólucro membranar externo, o que irá contribuir para a baixa antigenicidade das infecções.

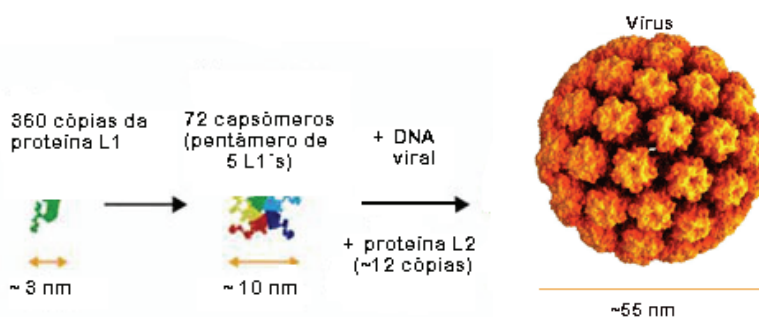


Figura 4 – Estrutura de um HPV (adaptado de <http://www.static.flickr.com/>).

O genoma do HPV pode ser dividido em três regiões distintas. Duas delas, as regiões Precoce e Tardia contêm uma série de *open reading frames* (ORFs) que codificam proteínas virais. A região precoce (E de *early*) representa cerca de 45% do genoma viral e contém 6 ORFs (E_1 , E_2 , E_4 , E_5 , E_6 e E_7) que codificam proteínas envolvidas na replicação do DNA, regulação transcricional e transformação celular. A região tardia (L de *Late*) engloba em cerca de 40% da totalidade do genoma, duas longas ORFs que codificam as proteínas estruturais da cápside (L_1 e L_2) (de Villiers *et al.*, 2004; Howley *et al.*, 2001).

Quadro II – Funções dos genes que compõem o genoma do HPV (adaptado de Howley *et al.*, 2001)

ORFs	Função
L ₁	Proteína <i>major</i> da cápside
L ₂	Proteína <i>minor</i> da cápside
E ₁	Inicia a replicação do DNA viral; helicase
E ₂	Regula a transcrição; envolvida na replicação do DNA viral; manutenção do genoma
E ₄	Actua tardiamente; envolvida na maturação do vírus
E ₅	Interage com factores de crescimento
E ₆	Proteína transformante dos HPVs; degrada a proteína p53; activa a telomerase
E ₇	Proteína transformante dos HPVs; liga-se à proteína pRb

Entre estas duas regiões está localizada uma outra região denominada LCR (*Long Control Region*) ou URR (*Upstream regulatory region*). Com cerca de 1Kb de tamanho, esta região não-codificadora contém elementos responsáveis pela regulação da transcrição e replicação viral (Howley *et al.*, 2001; Hebner e Laimins, 2006). Estas três regiões em todos os papilomavírus estão separadas por dois locais de poliadenilação (pA): os locais precoce (A_E) e tardio (A_L).

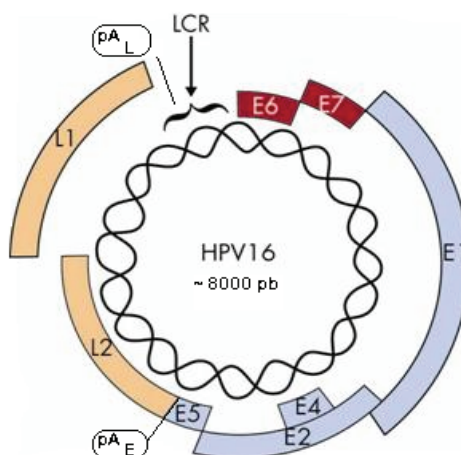


Figura 5 – Organização do genoma de um HPV (adaptado de <http://www.merkmedicus.com/>).

Os genes E₁, E₂, L₁ e L₂ são particularmente bem conservados entre os vários tipos de HPV, sendo que o gene L₁ é, entre todos, o que apresenta o maior nível de conservação. Por este motivo, este gene tem sido usado para identificação de novos tipos de HPV. Assim, um novo HPV isolado é reconhecido como tal, quando a sequência de DNA do gene L₁ difere em mais de 10% da sequência de um tipo de HPV já conhecido. Diferenças entre 2 e 10% definem um subtipo e menos de 2% de homologia, uma variante (de Villiers *et al.*, 2004).

Os HPVs são classificados de baixo-risco ou alto-risco com base no seu potencial carcinogénico. Desta forma, HPVs de baixo-risco que incluem, entre outros, os tipos 6 e 11, são tipicamente encontrados em verrugas genitais e outras lesões benignas estando ausentes em carcinomas invasivos. Em contrapartida, a designação de alto-risco é atribuída aos HPVs associados maioritariamente a carcinomas do colo do útero, bem como outras neoplasias anogenitais e da cabeça e pescoço, estando neste grupo incluídos os HPVs 16, 18, 31, 33, 45 e 46 entre outros (zur Hausen, 2002; Hebner e Laimins, 2006). Outros autores distinguem ainda um outro grupo de HPVs que engloba os tipos virais detectados tanto em lesões benignas como em carcinomas invasivos. Estes são designados como HPVs de risco intermédio e incluem os HPVs dos tipos 35, 51, 52 e 58 (Furumoto e Irahara, 2002).

2.2.2. Ciclo de vida de um HPV

A entrada de um HPV na célula epitelial faz-se através de microabrasão na superfície epitelial do colo do útero e, embora o receptor específico não tenha sido ainda identificado, evidências sugerem que a alfa-6-integrina e o sulfato de heparina são necessários para a infecção (Evander *et al.*, 1997; Giroglou *et al.*, 2001).

O ciclo-celular de um HPV de alto-risco divide-se em duas fases:

1) Fase Não-Produtiva: Esta fase inicia-se logo após a entrada do vírus na célula hospedeira. O genoma viral vai então estabelecer-se no núcleo, sob a forma de plasmídeo extracromossomal, existindo em baixo número de cópias, cerca de 50 a 100 por célula (Hebner e Laimins, 2006; Stubenrauch *et al.*, 1999). Este acontecimento tem lugar na camada basal do epitélio, onde as células infectadas, de elevado poder proliferativo, se dividem e distribuem o DNA viral. Como consequência, uma das células-filha migra através da membrana basal iniciando um processo de diferenciação que irá conduzir à fase produtiva do ciclo.

2) Fase Produtiva: Durante esta fase, que ocorre nas camadas mais superficiais do epitélio, o genoma do HPV sofre amplificação. São activadas as funções tardias, levadas a cabo pelas proteínas *Late*, culminando o ciclo-celular com a formação das novas partículas virais. De facto, embora a infecção ocorra nas células indiferenciadas de elevado poder proliferativo, é somente nas células diferenciadas que a replicação viral tem lugar.

Assim, após infecção, os primeiros genes a serem expressos são os que codificam para as proteínas E_1 e E_2 . Estas vão complexar-se para que, com maior afinidade, se liguem a sequências reconhecidas na região LCR dos HPV. No HPV16 são quatro os locais de ligação da proteína E_2 e localizam-se imediatamente antes do promotor precoce (P_{97}), o qual é responsável pela expressão dos genes precoces e regulado negativamente pela proteína E_2 (Romanczuk e Howley, 1992; Zheng e Baker, 2006).

Os genes tardios, por sua vez, iniciam a sua transcrição após diferenciação do epitélio a partir de sequências situadas no ORF E_7 . No HPV16 este promotor tardio situa-se no nucleotídeo 670, designando-se por isso de P_{670} (Grassmann *et al.*, 1996). Na verdade, o evento chave na passagem da fase não-produtiva para a fase produtiva parece ser a mudança de expressão de E_1 e E_2 do promotor P_{97} para o promotor P_{670} .

Uma vez que este último não sofre repressão pela E₂, esta troca irá resultar num aumento dos níveis das duas proteínas (Stubenrauch *et al.*, 1999).

2.2.3. Transformação celular

Embora o DNA do HPV exista na forma extracromossomal nas lesões benignas e pré-malignas, à medida que as lesões progridem para carcinoma, o DNA viral, na grande maioria das vezes, integra-se no cromossoma do hospedeiro (Pett e Coleman, 2007). Sabe-se que células que transportam o DNA do vírus na forma integrada apresentam uma maior taxa de proliferação *in vitro*, o que faz com que a integração esteja associada a um pior prognóstico e ao desenvolvimento de resistência à terapêutica.

O local específico de integração é variável consoante a neoplasia. No caso do cancro do colo do útero, este evento tem lugar na vizinhança das ORFs E₁ e E₂ em regiões de elevada instabilidade denominadas por *Common Fragile Sites* (CFSs) (Thorland *et al.*, 2003). Como consequência, E₂ e frequentemente parte de E₁ são inactivadas e parte de E₂ e das ORFs que lhe são adjacentes, como E₄, E₅ e parte de L₂ são regularmente perdidas (zur Hausen, 2002; Howley *et al.*, 2001).

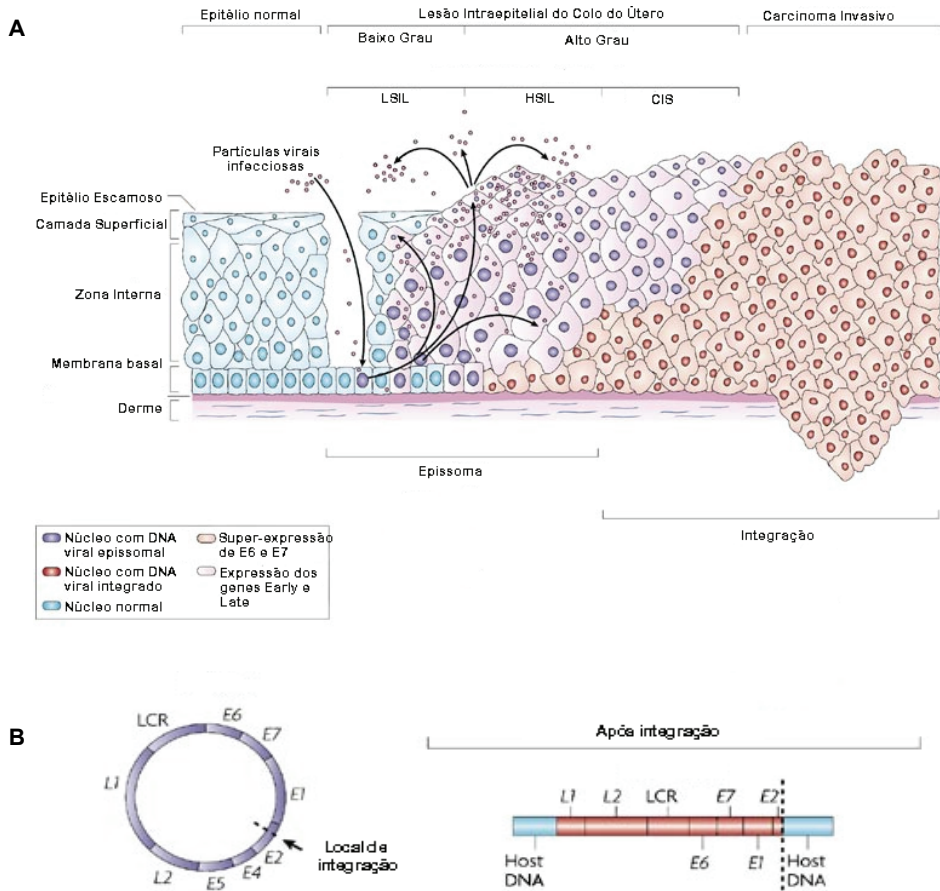


Figura 6 – Ciclo de Vida de um HPV. (A), evolução ao longo do epitélio uterino de uma infecção por HPV. (B), organização do genoma de um HPV e sua integração no DNA do hospedeiro (adaptado de Woodman *et al.*, 2007).

Uma vez que E₂ actua normalmente como um regulador negativo da transcrição dos genes E₆ e E₇, a sua perda de expressão após integração levará ao aumento da expressão destes dois genes (Burd, 2003). Nos HPVs de alto-risco, as proteínas oncogénicas E₆ e E₇ têm elevada afinidade para as proteínas p53 e pRb, respectivamente. Esta ligação vai desencadear um distúrbio na funcionalidade normal destas proteínas celulares e conseqüentemente permitir uma maior acumulação de erros no DNA. A inactivação de E₂ aumenta assim a capacidade de imortalização do vírus (Romanczuk e Howley, 1992).

3. REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR E CANCRO

3.1. Ciclo Celular

A proliferação celular é efectuada através de uma sequência ordenada de eventos que duplicam os seus componentes e depois a dividem em duas. Este conjunto de eventos, conhecido como ciclo celular, descreve assim o comportamento das células, como estas crescem e como se dividem (Reed, 2001).

O ciclo celular engloba uma componente longa, designada Interfase, a qual por sua vez é dividida nos períodos G₁, S e G₂ e uma outra componente de curta duração, designada por Mitose (período M). A duração destas fases do ciclo celular varia consideravelmente nos diferentes tipos de células (Shacherfold *et al.*, 1999) – Figura 7.

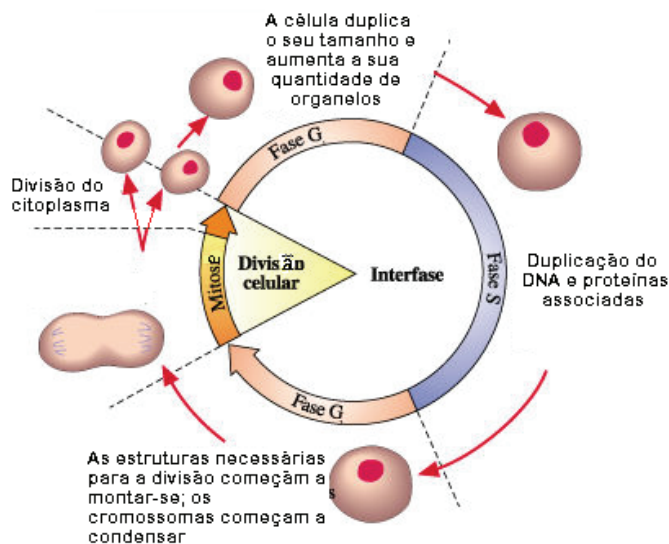


Figura 7 – Ciclo celular de uma célula eucariótica (<http://www.edu.aragob.es/>).

Na fase G1 são sintetizados diversos componentes celulares como membranas e organelos, que praticamente duplicam o tamanho da célula. Se as condições nutritivas e o tamanho celular não forem suficientes para avançar para a fase subsequente do ciclo, as células retardam o avanço de G1 e entram num estado de inactivação denominado por G0, no qual podem permanecer por dias, semanas ou até mesmo anos antes de reassumirem a proliferação (Reed, 2001).

Na fase S ocorre a replicação complementar e semi-conservativa do DNA. Como tal, no fim desta fase, a quantidade de DNA é o dobro da quantidade normal da espécie humana.

Durante a fase G2 as células crescem e produzem uma quantidade extra de proteínas de forma a assegurar que duas células-filhas podem ser viavelmente formadas. Finalmente a célula entra na fase M. Nesta fase, os cromossomas organizam-se de tal forma, que duas células-filhas geneticamente idênticas são formadas, após as quais, o ciclo pode reiniciar-se (Houtgraaf *et al.*, 2006).

Sob condições normais, o ciclo celular prossegue sem que hajam interrupções. Contudo, quando ocorrem danos no DNA, quer sejam estes de natureza física, química ou biológica, as células tem a capacidade de parar transientemente a sua proliferação em G1, S e G2 (Shakelford *et al.*, 1999).

3.2. Pontos de controlo do ciclo celular

O termo *checkpoint* (ponto de controlo) é usado para descrever o mecanismo de controlo que assegura que cada evento do ciclo celular é correctamente terminado antes do evento subsequente ter início. Desta forma, a perda ou atenuação funcional dos

pontos de controlo do ciclo celular, está intrinsecamente relacionada com o desenvolvimento de cancro, pela redução na eficiência da reparação dos danos no DNA (Kaufmann e Paules, 1996).

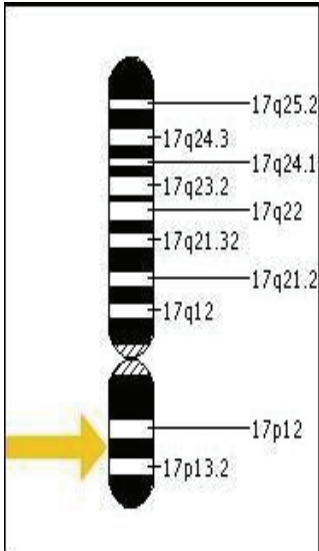
Três pontos de controlo foram particularmente bem caracterizados nas células eucarióticas. Para assegurar a integridade do DNA antes da replicação na fase S, as células activam o ponto de controlo de G1, situado na transição G1/S, após serem detectados quaisquer danos no DNA (Lukas J *et al.*, 2004; Pietenpol e Stewart, 2002). A proteína p53 tem um papel crucial neste ponto de controlo, activando uma série de proteínas e induzindo a reparação do DNA danificado ou promovendo a morte celular programada da célula.

O ponto de controlo Intra-S, situado nesta mesma fase, é definido como sendo crucial para a sinalização e eliminação das aberrações cromossómicas. Lesões durante a fase S, levam assim a uma rápida e reversível diminuição na síntese do DNA (Shackelford *et al.*, 1999).

Se as células entram em mitose antes da completa replicação dos seus cromossomas, a separação das cromátides-filhas irá resultar numa extensa aberração cromossómica. Para minimizar estes acontecimentos não desejados, as células accionam o ponto de controlo de G2, situado imediatamente na passagem G2/M, bloqueando temporariamente as células em fase G2, até a integridade dos cromossomas ser restabelecida. Em casos mais severos é activada a morte programada da célula (Pietenpol e Stewart, 2002).

3.3. Genes envolvidos na regulação do controlo do ciclo celular

3.3.1. Gene *TP53*, Ciclo celular e Cancro



O gene *TP53*, descrito pela primeira vez em 1979, foi o primeiro gene supressor-tumoral a ser identificado (Vogelstein *et al.*, 2000). Localiza-se no braço curto do cromossoma 17, mais propriamente na região 17p13 (figura 8) e engloba um conjunto de 11 exões que codificam uma fosfoproteína nuclear designada p53 (Slee *et al.*, 2004).

Figura 8 – Localização do gene *TP53* no cromossoma 17. (<http://ghr.nlm.nih.gov/>)

Cerca de metade dos tumores humanos contêm mutações inativadoras no gene *TP53*. A severidade das manifestações de uma mutação neste gene, correlaciona-se com a sua localização, sendo maior se está localizada nas sequências que codificam o domínio da proteína que se liga ao DNA. (Bode e Dond, 2004; Levine, 1997).

A p53 desempenha um importante papel no controlo da proliferação celular, quer parando o ciclo em G1/S (ponto de controlo de G1) de modo a permitir a reparação em caso de lesões no DNA, quer promovendo a apoptose, em resposta a danos mais extensos não passíveis de reparação (Vogelstein *et al.*, 2000).

Os 393 aminoácidos que constituem a p53 estão distribuídos em 3 domínios funcionais – Figura 9.

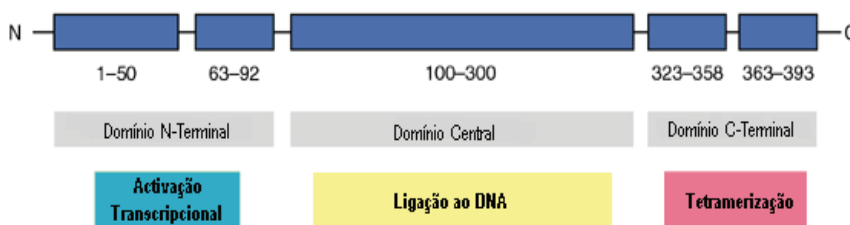


Figura 9 – Estrutura da proteína p53 (adaptado de <http://www.expertreviews.org/>).

A região central da p53, que corresponde ao domínio que se liga ao DNA, é a região mais frequentemente mutada, sendo atingida por mais de 90% da totalidade das mutações que afectam o gene *TP53*. Estas mutações são, na grande maioria das vezes, do tipo *missense*, resultando na substituição de um único aminoácido (Bode e Dond, 2004; Levine, 1997).

Os níveis celulares de p53 aumentam dramaticamente quando a célula é alvo de diferentes ameaças, tais como a radiação ionizante/ultra-violeta. Este aumento na quantidade da proteína reflecte-se numa maior estabilidade, conseguida pela diminuição da interacção entre a p53 e a proteína Mdm2 (Slee *et al.*, 2004). A proteína Mdm2 funciona como um regulador da actividade da p53, bloqueando a sua actividade transcricional e transportando-a para o citoplasma, local onde vai ser degradado por um processo de proteólise mediado pela ubiquitina (Alarcon-Vargas e Ronai, 2002).

Além das mutações inactivadoras, presentes em várias neoplasias humanas, sabe-se que outras formas de inactivação atingem o gene *TP53* e o seu produto, uma vez que a p53 na forma não-mutada (*wild-type*) é característica de alguns tipos de tumores, nomeadamente no cancro do colo do útero. A expressão aumentada da proteína Mdm2, a deleção do gene p14, o transporte da p53 para o citoplasma e ainda a infecção por alguns vírus, são assim formas extra-mutação que vão inactivar a p53, contribuindo para

o aumento da instabilidade genética que poderá levar ao desenvolvimento de neoplasias por acumulação de erros no DNA (Vogelstein *et al.*, 2000).

- Polimorfismos no gene *TP53*

As variações genéticas no gene *TP53* são eventos que ocorrem com alguma regularidade, tendo sido já descritos pelo menos 10 diferentes variantes neste gene (Weston *et al.*, 1997). Face ao papel crucial do gene *TP53* na manutenção da integridade genómica, os polimorfismos (SNPs) que afectam este gene poderão ter assim uma contribuição significativa para o desenvolvimento de determinados tumores (Lane, 1992). Uma das variantes polimórficas mais bem estudadas no gene *TP53*, descrito por Matlashewski e colaboradores, é responsável por codificar no codão 72 da proteína uma transição do aminoácido Arginina (Arg/ R) para Prolina (Pro/ P) (Matlashewski *et al.*, 1987). Este polimorfismo (R72P) tem sido relacionado com susceptibilidade aumentada para o desenvolvimento de várias neoplasias, nomeadamente para cancro do colo do útero (Storey *et al.*, 1998) e cancro da bexiga (Soulitzis *et al.*, 2002), sendo este efeito provocado pelo alelo produtor da variante Arg. Storey e colaboradores mostraram que a proteína contendo um resíduo de arginina era significativamente mais susceptível à degradação mediada pela proteína E6 dos HPVs de alto-risco do que a proteína contendo um resíduo de prolina, revelando assim uma associação positiva entre este polimorfismo e o desenvolvimento de cancro do colo do útero. Porém, o papel deste polimorfismo é ainda alvo de controvérsia, desde que estudos mais recentes não demonstraram esta associação (Abba *et al.*, 2003; Mitra *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2007).

3.3.2. Gene *53BP1*, Ciclo celular e Cancro

O gene supressor-tumoral *53BP1* (*p53 Binding protein 1*) é um importante regulador da estabilidade genómica, nomeadamente na resposta celular a quebras da dupla hélice do DNA. Localiza-se no cromossoma 15q15-21 (figura 11) e codifica uma proteína de 1972 aminoácidos, a p53BP1 (Iwabuchi *et al.*, 1998).

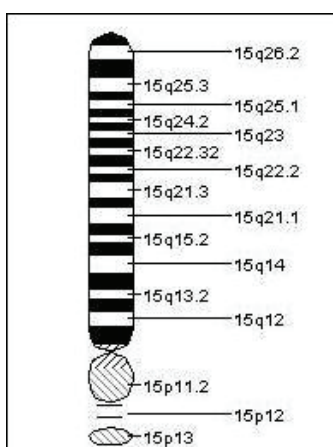


Figura 11 – Localização do gene *53BP1* no cromossoma 15 (adaptado de <http://ghr.nlm.nih.gov/>).

Sabe-se que a inativação deste gene está associada a uma maior predisposição para o desenvolvimento de tumores, causada por uma profunda hipersensibilidade à RI (Jowsey *et al.*, 2007).

A proteína 53BP1 (p53BP1) foi inicialmente proposta como sendo um coativador transcripcional da p53. Contudo, ficou provado que a p53BP1 interage com a região central da p53, isto é, com o domínio responsável pela ligação ao DNA e não com o domínio N-terminal, como seria de esperar para um coativador transcripcional (Iwabuchi *et al.*, 1994; Mochan *et al.*, 2004).

A p53BP1 (figura 12) contém dois domínios BRCT (BRCT-1 e BRCT-2) situados na região C-terminal, aos quais estão geralmente presentes em proteínas envolvidas na reparação do DNA e controlo do ciclo celular (Callebaut *et al.*, 1997; Bork *et al.*, 1997). O domínio Tudor, por seu lado, é necessário para a proteína localizar as regiões do DNA que se encontram danificadas (Iwabuchi *et al.*, 2003).

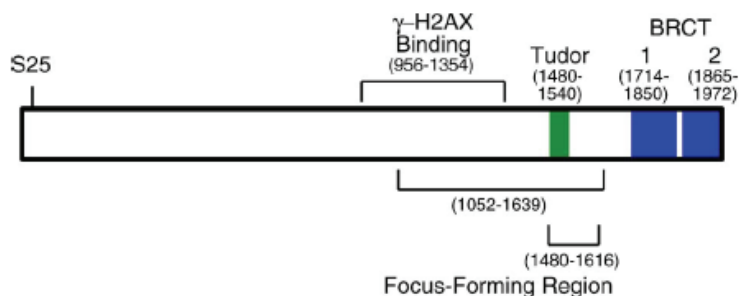


Figura 12 – Estrutura da proteína 53BP1 (Mochan *et al.*, 2004).

A sinalização das quebras de dupla hélice que ocorrem no DNA é ainda um evento controverso. A proteína ATM tem, sem margem para dúvida, um papel primordial neste processo. Todavia, pensa-se que a sua acção seja indirecta, necessitando da p53BP1 para detectar as alterações da cromatina que ocorrem fisiologicamente em resposta às quebras na dupla hélice do DNA (Zgheib *et al.*, 2005; Mochan *et al.*, 2003; Bakkenist e Kastan, 2003).

De facto, embora se saiba que a p53BP1 está de algum modo, envolvida na sinalização das quebras da dupla hélice do DNA, o seu verdadeiro envolvimento no ciclo celular é ainda alvo de debate. Três modelos podem ser considerados: o primeiro coloca a p53BP1 funcionando posteriormente à pATM. De acordo com este modelo, a p53BP1 funciona como um adaptador que recruta vários substratos para a pATM de forma a

facilitar a fosforilação da p53BP1. Nesta situação, a activação da pATM não necessita por isso, da p53BP1 (Wang *et al.*, 2002). Um outro modelo faz da p53BP1 a responsável pela activação da pATM nas células que apresentam quebras de dupla hélice no DNA (Mochan *et al.*, 2003). Finalmente, da combinação dos modelos anteriores, surge um último modelo, para o qual, a p53BP1 poderá activar a pATM e simultaneamente, servir de adaptador no recrutamento de outros substratos (Rappold *et al.*, 2001).

Independentemente do modo de acção da p53BP1, a sua localização nuclear imediatamente após a exposição a agentes que introduzem quebras de dupla hélice no DNA e o seu envolvimento na sinalização do DNA danificado, são já dados adquiridos (Anderson *et al.*, 2001).

- Polimorfismos no gene *53BP1*

Estudos genéticos em modelos animais, mostram que a inactivação do gene *53BP1* está associada ao desenvolvimento de vários tipos de tumores (Gorgoulis *et al.*, 2005). Da mesma forma, é biologicamente plausível que a presença de variantes polimórficas (SNPs) no gene *53BP1*, nomeadamente em regiões promotoras e codificantes, venham a afectar os mecanismos responsáveis pela reparação do DNA aumentando assim a predisposição para cancro (Ma *et al.*, 2006).

Vários polimorfismos foram recentemente identificados em toda a extensão do gene *53BP1*. Uma das variantes mais bem estudadas consiste numa transição de uma Citosina (C) para Guanina (G), no nucleotídeo 1236 do exão 9 do gene, resultando de uma troca do aminoácido Ácido aspártico (Asp) para Glutamina (Glu) na posição 353 da proteína (Frank *et al.*, 2005).

Estudos já publicados mostraram uma associação entre esta variante e o desenvolvimento de cancro da mama (Ma *et al.*, 2006).

3.3.3. Gene *ATM* (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), Ciclo Celular e Cancro

Entre os tipos de lesões que ocorrem no DNA, a quebra da dupla hélice é de todas a maior ameaça para a integridade do genoma eucariota. Um dos agentes mais conhecidos, causador deste tipo de lesão, é a radiação ionizante (RI) que actua danificando várias biomoléculas da célula, incluindo lípidos e promovendo a formação de espécies de oxigénio reactivo (Kurz e Lees-Miller, 2004).

Para responder a esta ameaça, as células eucarióticas desenvolveram mecanismos que detectam a presença deste DNA danificado e iniciam uma resposta de forma a repará-lo. Esta resposta, que varia consoante a extensão da lesão, é mobilizada pela acção de uma proteína cinase, a pATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*).

O gene *Ataxia-Telangiectasia Mutated* (*ATM*) foi mapeado no cromossoma 11q22-23 em 1988 (Gatti *et al.*, 1988) (figura 13) e codifica uma proteína quinase (pATM) (figura 14), identificada como sendo produto do gene mutado/inactivado na Ataxia-Telangiectasia (A-T), uma desordem genética caracterizada por uma degeneração neural progressiva, deficiência imunológica, radiosensibilidade e risco aumentado para o desenvolvimento de cancro (Khanna e Chenevix-Trench, 2004; Shiloh, 2003).

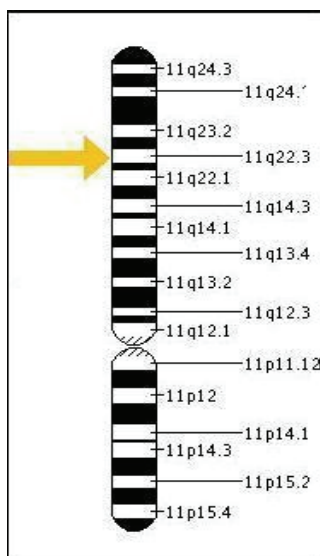


Figura 13 – Localização do gene *ATM* no cromossoma 11 (<http://ghr.nlm.nih.gov/>).

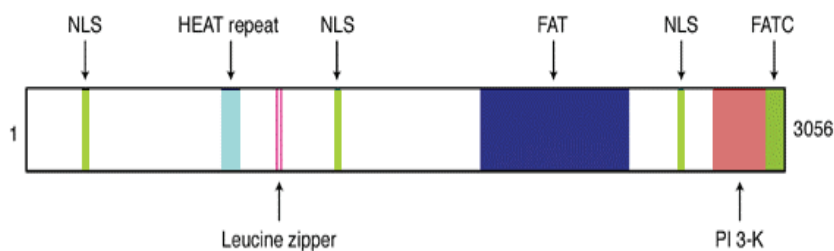


Figura 14 – Estrutura da proteína pATM (adaptado de <http://www.expertreviews.org/>).

A pATM desempenha um papel vital na manutenção da integridade do genoma humano. Quando inactiva a pATM é um dímero com peso molecular de cerca de 350KDa. Nesta configuração, o domínio cinase de cada molécula é assim bloqueado pelo domínio FAT da outra. Por outro lado, após a exposição a RI ou outro tipo de agente que introduza quebras de dupla hélice no DNA, a pATM responde com um rápido aumento da sua actividade cinase e, simultaneamente, é activada por auto-fosforilação da serina na posição 1981 (Ser₁₉₈₁) no domínio FAT, dando-se a dissociação em monómeros. Neste

ponto, a proteína atinge um tamanho de 370KDa (Bakkenist e Kastan, 2003; Chen e Lee, 1996; Shiloh, 2003).

A fosforilação da pATM ocorre após o reconhecimento das zonas do DNA danificadas. Pensa-se que este reconhecimento seja não ao nível das regiões de quebra de dupla hélice propriamente ditas, mas sim ao nível das alterações na estrutura da cromatina da qual derivam (Khanna e Chenevix-Trench, 2004; Bakkenist e Kastan, 2003). Porém, é ainda dúbio, se a pATM é a responsável directa deste reconhecimento ou, se por outro lado, será recrutada, por acção de proteínas adicionais, para os locais de cromatina que se encontram danificados (Kurz e Lees-Miller, 2004).

Como resultado da sua activação, a pATM vai fosforilar uma série de proteínas envolvidas na activação dos pontos de controlo do ciclo celular (nomeadamente a p53), de forma a retardar o progresso da célula, em caso de danos no DNA, permitindo a reparação desses mesmos danos ou, em situações mais graves, activando um programa de morte celular programada (Khanna, 2000; Khanna et al., 2001).

Os mecanismos de controlo do ciclo celular são deste modo importantes para a prevenção da instabilidade genética e o desenvolvimento de cancro. A pATM está envolvida na regulação dos pontos de controlo G1, Intra-S e G2, em resposta a quebras nas duas cadeias do DNA (Shachelford *et al.*, 1999). A paragem do ciclo celular, no ponto de controlo G1 é mediada pela acção da p53. Assim, quando se dá a quebra da dupla hélice do DNA, a pATM vai fosforilar directa ou indirectamente a p53 em múltiplos locais, bem como o seu regulador negativo, Mdm2. Consequentemente, a interacção p53-Mdm2 é diminuída, resultando na estabilização e activação transcripcional da p53 (Khanna e Chenevix-Trench, 2004; Meulmeester *et al.*, 2005). O ciclo celular é assim retardado de forma a prevenir a replicação das lesões do DNA.

A acção da pATM no ponto de controlo Intra-S passa pela fosforilação de diferentes proteínas que conduzirão a um estado transiente de supressão na síntese do

DNA. A pATM entra novamente em acção no ponto de controlo de G2, retardando a entrada em Mitose das células irradiadas em G2. Outras proteínas contribuem conjuntamente para esta tarefa, nomeadamente a proteína 53BP1 (Khanna e Chenevix-Trench, 2004).

- Polimorfismos no gene *ATM*

Mais de 80 polimorfismos foram identificados no gene *ATM*, o que o torna um dos genes mais variáveis em todo o genoma humano (Thorstenson *et al.*, 2001). Uma das variantes polimórficas (SNPs) que ocorre com maior frequência dá-se ao nível do nucleotídeo 5557 correspondente ao exão 9 do gene. Caracteriza-se como sendo uma transição de uma Guanina (G) para uma Adenina (A), o que resulta numa mudança do aminoácido Ácido aspártico (Asp) para Asparagina (Asn) na posição 1853 da proteína (D1853N) (Maillet *et al.*, 1999). Este polimorfismo foi já descrito como tendo influência no desenvolvimento de determinadas neoplasias, nomeadamente no cancro da mama (Heikkinen *et al.*, 2005), cancro colo-rectal não polipóide (Maillet *et al.*, 2000), cancro da próstata (Angèle *et al.*, 2004) e leucemia linfoblástica (Meier *et al.*, 2005). No entanto, até à data não foram publicados resultados referentes a este polimorfismo no cancro do colo do útero.

OBJECTIVOS



Os objectivos deste trabalho foram:

- Analisar as frequências do polimorfismo no codão 72 da P53, do polimorfismo G5557A no nucleotídeo 5557 do gene *ATM* e do polimorfismo no nucleotídeo 1236 do gene *53BP1*, num grupo de mulheres sem qualquer tipo de lesão oncológica/cancro do colo do útero, bem como num grupo de mulheres com lesões/cancro do colo do útero;

- Avaliar a existência de associação entre a frequência dos diferentes polimorfismos estudados e a susceptibilidade para cancro do colo do útero.

**MATERIAL E
MÉTODOS**



1. POPULAÇÃO/ PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Foi efectuado um estudo retrospectivo incluindo um total de 700 amostras de raspagens cervico-vaginais, provenientes de mulheres da região Norte de Portugal, admitidas no Instituto Português de Oncologia do Porto. Todas as participantes deram o seu consentimento informado antes da sua inclusão no estudo.

As raspagens cervico-vaginais foram avaliadas para o tipo e grau de lesão de acordo com a classificação de Bethesda e incluíam 334 casos de mulheres sem lesão/cancro do colo do útero (N) (idade mediana de 45.0 anos), 114 lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) (idade mediana de 42.5 anos), 107 lesões intraepiteliais de alto-grau incluindo carcinoma *in situ* (HSIL) (idade mediana de 44.5 anos), 20 carcinomas invasivos do colo do útero (ICC) (idade mediana de 55.0 anos) e 125 lesões atípicas de significado desconhecido (ASCUS) (idade mediana de 51.0). Todos as lesões e carcinomas invasivos foram confirmados histologicamente.

O exame ginecológico foi efectuado por um oncologista do Serviço de Ginecologia do IPO do Porto, havendo a recolha de um esfoliado de células do colo do útero. Estas células foram transportadas para o laboratório em tubos contendo uma solução salina de tampão, $\text{pH}=8.0$, sendo armazenadas a -20°C até ser feita a extracção do DNA.

2. EXTRACÇÃO DO DNA

Procedeu-se à extracção do DNA das raspagens cervico-vaginais foi efectuada utilizando o kit comercial *High Pure Viral Nucleic Acid (Roche Applied BioScience)*.

A extracção foi efectuada a partir de 200µl de amostra, às quais se adicionou 200µl de tampão de ligação, previamente misturado com 50µl de Proteinase K (*Boehringer Mannheim 745723*) que facilita a digestão proteica. Agitou-se e incubou-se a amostra durante 10 minutos a 72°C. Após este período, foram adicionados mais 100µl do tampão de ligação, tendo-se continuado a extracção de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA foi posteriormente armazenado a -4°C ou -20°C consoante o tempo de armazenamento previsto.

3. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS

3.1. Amplificação e identificação do polimorfismo R72P na p53

O polimorfismo R72P na p53 foi analisado por duas metodologias distintas: 1) AS-PCR (*Allele Specific-Polymerase Chain Reaction*) e 2) *Real-Time* PCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*).

Numa primeira análise usou-se a metodologia de AS-PCR para 250 casos, sendo que 50 destes foram posteriormente analisados através de *Real-Time* PCR (*TaqMan SNP Genotyping Assay*) de forma a validar os resultados. Os casos analisados por ambos os métodos revelaram ser todos concordantes, tendo os restantes casos sido analisados somente pela metodologia de *Real-Time* PCR (*TaqMan SNP Genotyping Assay*).

3.1.1. Método AS-PCR:

As reacções para cada um dos alelos foram efectuadas separadamente num termociclador, Biometra *T-Gradient*, para um volume de reacção total de 50µl, contendo 0.2µg de DNA, 1U de Taq DNA polimerase (*MBI Fermentas #EPO402*), 1x do tampão de reacção, 1.5mM de MgCl₂ (*MBI Fermentas*), 0.2mM de dinucleosídeos trifosfato (dNTPs) (*MBI Fermentas #RD192*) e 0.25µM de cada um dos dois *primers* específicos para a região pretendida. Para identificar a presença do alelo Arg utilizou-se o par de *primers* ARG- (5´ - CTG GTG CAG GGG CCA CGC-3´) e TP53+ (5´ - TCC CCC TTG CCG TCC CAA-3´) e o par de *primers* PRO+ (5´ - GCC AGA GGC TGC TCC CCC-3´) e TP53- (5´ - CGT GCA AGT CAC AGA CTT-3´), para identificar a presença do alelo Pro. As condições de reacção foram as seguintes: para activar a enzima fez-se uma pré-desnaturação inicial durante 5 minutos a 95°C, seguiram-se 45 ciclos de desnaturação a 94°C durante 60 segundos, o emparelhamento dos *primers* (*annealing*) a 60°C/ 55°C (para os *primers* do alelo Arg e Pro respectivamente) durante 45 segundos, uma extensão a 72°C durante 60 segundos e finalmente, uma última extensão a 72°C por 5 minutos.

Para identificar os fragmentos de DNA, 15µl de cada produto obtido na PCR juntamente com 2µl de tampão de aplicação (*Loading Dye – Gibco BRL 10816-D15*) foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1.5% (p/v) em TBE (TrisBase 109g/L – *Merck 348610*; Ácido Bórico 55.5g/L – *Merck 203667*; EDTA 9.3g/L – *Merck 108418*), corados com brometo de etídeo.

Os géis foram então visualizados sob luz ultra-violeta através do equipamento *Image Master VDS (Pharmacia Biotech)*. Foi possível obter dois fragmentos, um de 141pb indicador da presença do alelo que codifica a arginina (Arg) e outro de 177pb indicador do alelo que codifica a prolina (Pro) (figura 14) (Storey et al., 1998).

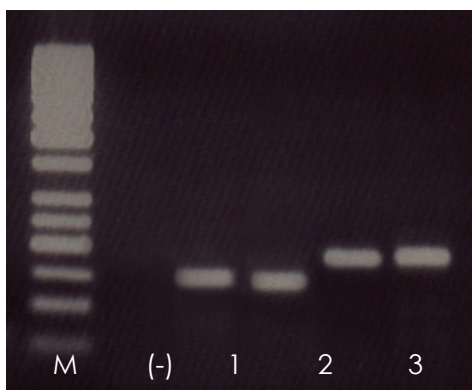


Figura 14 – Representação de um gel de agarose indicativo da presença dos alelos do gene *TP53*. M, Marcador molecular de 50pb; casos 1 e 2, alelo Arg (141pb) e casos 2 e 5, alelo Pro (177pb).

3.1.2. Método de *Real-Time PCR*:

O polimorfismo foi analisado pela técnica de discriminação alélica, efectuada segundo instruções do fabricante com as sondas *TaqMan C__2403545_10*. As sondas utilizadas eram específicas para cada alelo: VIC – alelo G (Arg) e FAM – alelo C (Pro).

Para discriminação alélica, usou-se uma sonda marcada com dois fluorocromos distintos (Fam e Vic) específicos para cada alelo: AGG AGT TGC TGG TGC AGG GGC CAG G [C/G] GGG GAG CAG CCT CTG GCA TTC TGG G. A reacção de amplificação foi efectuada para um volume de 6µl/caso contendo 2.5µl de 2x *TaqMan Universal Master Mix*, 0.125µl de 40x *SNP Genotyping Assay*, 2.375µl de água esterilizada, com 1µl de DNA da amostra.

Os produtos amplificados foram detectados e analisados através do sistema 7300 *System Sequence Detection Software* (versão 1.2.3, *Applied Biosystems*).

As condições de reacção foram as seguintes: uma pré-desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguindo-se 45 ciclos de 92°C por 15 segundos para desnaturação e de 60°C durante 1 minuto para emparelhamento dos *primers* e extensão.

Os produtos foram amplificados e analisados através do sistema 7300 *ABIPrism System Sequence Detection Software* (versão 1.2.3, *Applied Biosystems*) – Figura 15.

A determinação do protótipo é efectuada através do respectivo *software*, obtendo-se uma razão entre a fluorescência dos fluorocromos VIC e FAM, sendo que cada um deles corresponde a um único alelo.

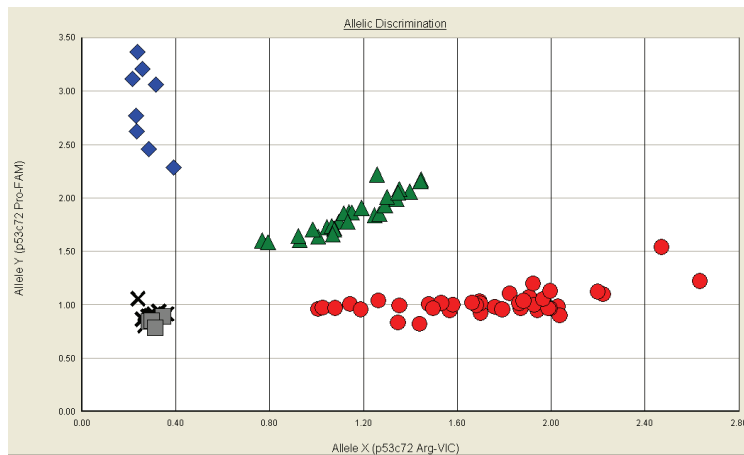


Figure 15 – Representação de um *Real-Time* PCR para o polimorfismo R72P na p53.

(cor azul, alelo Pro; cor vermelha, alelo Arg; cor verde, ambos os alelos; cor cinza, controlos negativos)

3.2. Amplificação e identificação do polimorfismo C1236G no gene *53BP1*

O polimorfismo C1236G no gene *53BP1* foi analisado por *Real-Time* PCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*) usando-se as sondas *TaqMan* C__2944794_10. As sondas utilizadas eram específicas para cada alelo: VIC – alelo C e FAM – alelo G.

Para a discriminação alélica, usou-se uma sonda marcada com dois fluorocromos distintos (Fam e Vic) específicos para cada alelo: TTA GGC TTA CTT ACG TGG AAA GAC T [C/G] TCC TGA ACA AGG GAC CTC TGA CCA G. A reacção de amplificação foi efectuada

para um volume total de 6 μ l/caso incluindo 2.5 μ l de 2x *TaqMan Universal Master Mix*, 0.250 μ l de 40x *SNP Genotyping Assay*, 2.375 μ l de água esterilizada e 1 μ l de DNA da amostra.

Uma vez amplificados, os produtos foram então detectados e analisados através do sistema 7300 *ABIPrism System Sequence Detection Software* (versão 1.2.3, *Applied Biosystems*) – Figura 16.

As condições de reacção foram as seguintes: uma pré-desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguindo-se 45 ciclos de 92°C por 15 segundos para desnaturação e de 60°C durante 1 minuto para emparelhamento dos *primers* e extensão.

A determinação do protótipo foi efectuada através do respectivo *software*, tendo-se obtido uma razão entre a fluorescência dos fluorocromos VIC e FAM, sendo que cada um deles corresponde a um único alelo.

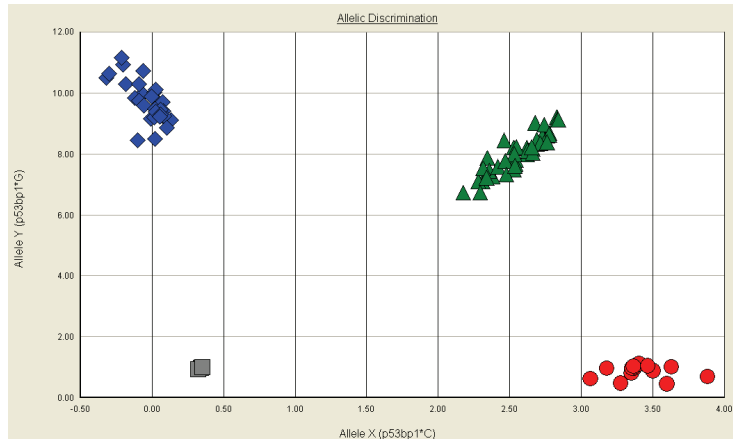


Figura 16 – Representação de um *Real-Time* PCR para o polimorfismo C1236G no gene *53BP1*.

(Cor azul, alelo G; Cor vermelha, alelo C; Cor verde, ambos os alelos; Cor cinza, controlos negativos)

3.3. Amplificação e identificação do polimorfismo G5557A no gene *ATM*

O polimorfismo G5557A no gene *ATM* foi amplificado por *Real-Time* PCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*) pela metodologia de discriminação alélica segundo instruções do fabricante, usando as sondas *TaqMan C__26487857_10*. As sondas utilizadas eram específicas para cada alelo: VIC – alelo A e FAM – alelo G.

Para a discriminação alélica, usou-se uma sonda marcada com dois fluorocromos distintos (Fam e Vic) específicos para cada alelo: CTT GAT TCA TGA TAT TTT ACT CCA A [A/G] ATA CAA ATG AAT CAT GGA GAA ATC T. A reacção de amplificação foi efectuada para um volume de 6µl/caso contendo 2.5µl de 2x *TaqMan Universal Master Mix*, 0.25µl de 20x *SNP Genotyping Assay*, 2.25µl de água esterilizada e com 1µl de DNA da amostra.

Os produtos amplificados foram detectados e analisados através do sistema 7300 *ABIPrism System Sequence Detection Software* (versão 1.2.3, *Applied Biosystems*) – Figura 17.

As condições de reacção foram as seguintes: pré-desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguindo-se 45 ciclos de 92°C por 15 segundos para desnaturação e de 60°C durante 1 minuto para emparelhamento dos *primers* e extensão.

A determinação do protótipo foi efectuada através do respectivo *software*, obtendo-se uma razão entre a fluorescência dos fluorocromos VIC e FAM, sendo que cada um deles corresponde a um único alelo.

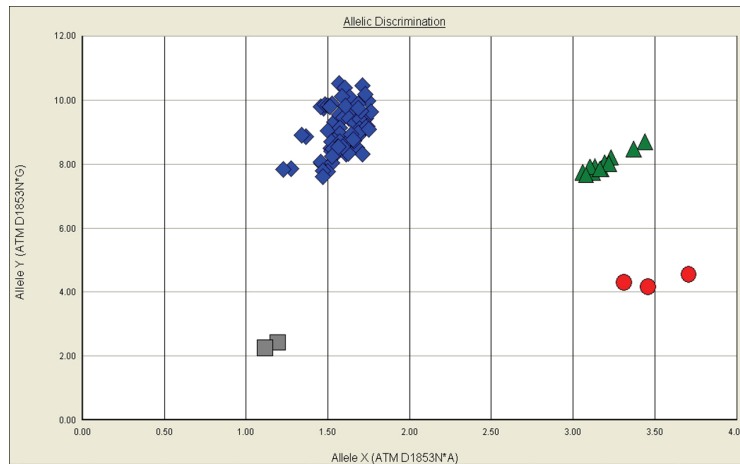


Figura 17 – Representação de um *Real-Time* PCR para o polimorfismo G5557A no gene *ATM*.

(Cor azul, alelo G; Cor vermelha, alelo A; Cor verde, ambos os alelos; Cor cinza, controlos negativos)

4. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A interpretação dos resultados foi efectuada com base nas amostras e resultados obtidos para cada polimorfismo, sendo a não detecção das variantes genéticas, a não concordância dos resultados após interpretação duvidosa ou a má qualidade do DNA, os factores principais para a exclusão de resultados ou amostras. Assim foram considerados válidos para a análise estatística 700 amostras no caso do polimorfismo R72P, 575 amostras para o polimorfismo C1236G e 484 amostras para o polimorfismo G5557A. Relativamente ao método de Captura Híbrida e pelo facto de serem necessários 4 μ l de DNA para cada análise, restaram 534, 434 e 443 casos respectivamente para os polimorfismos nos genes *TP53*, *53BP1* e *ATM*.

A análise estatística foi levada a cabo com o objectivo de avaliar a associação entre os diferentes polimorfismos e o desenvolvimento de lesões/cancro do colo do útero.

A análise dos resultados foi efectuada com o auxílio do *software* SPSS (*Statistical Package for Social Sciences, Version 13.0*) de forma a comparar as variáveis categóricas pelo teste do χ^2 com um nível de significância de 5%.

O quociente OR (*Odds Ratio*), indicador do factor de risco para determinado acontecimento num estudo e o respectivo intervalo de confiança a 95% (IC 95%) foram calculados como uma medida da associação entre o desenvolvimento de cancro do colo do útero e o polimorfismo em estudo.

Estimaram-se as curvas de probabilidade cumulativa em desenvolver lesões intraepiteliais/cancro do colo do útero, usando a representação gráfica de *Kaplan-Meier* e o teste *log-rank* para avaliar estatisticamente a heterogeneidade entre as curvas.

RESULTADOS



1. ANÁLISE DO POLIMORFISMO R72P NA P53

Da totalidade das nossas amostras, 534 tinham sido previamente testadas para a presença dos tipos de HPV de alto-risco através de Captura Híbrida (*Digene Corporation, Gaithersburg, USA*), sendo 245 dos casos positivos. Igualmente, 447 casos tinham sido testados para a presença de HPV16 tendo 72 deles resultado positivo.

No estudo do polimorfismo R72P foram analisadas 700 raspagens cervico-vaginais incluindo 334 casos de mulheres sem lesão/cancro do colo do útero (N), 114 lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL), 107 lesões intraepiteliais de alto-grau incluindo carcinoma in situ (HSIL) e 20 carcinomas invasivos do colo do útero (ICC) e 125 lesões atípicas de significado desconhecido (ASCUS).

A distribuição dos genótipos do polimorfismo no gene *TP53* e suas frequências nas amostras de raspagens cervico-vaginais são apresentadas no quadro III. O estudo revelou não existir nenhuma diferença estatisticamente significativa para as frequências dos diferentes genótipos nos vários grupos citológicos ($p=0.336$). Do mesmo modo, considerando o genótipo Arg/Arg como marcador de risco, não foi encontrada nenhuma associação significativa entre os portadores deste genótipo e risco aumentado para desenvolvimento de cancro do colo do útero.

Quadro III – Distribuição dos genótipos R72P entre os casos sem lesão/câncer do colo do útero e casos com lesão/câncer do colo do útero

Classificação citológica	Idade mediana	AA		AP		PP		Portador de P		P	OR	95% IC
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)					
N (n=334)	45.0	172(51.5)	135(40.4)	27 (8.1)	162 (48.5)	-	1.00	Referência				
Todas as lesões (n=241)	44.0	125(52.9)	90 (37.3)	26 (10.8)	116 (48.1)	0.933	1.02	0.73 - 1.41				
LSIL (n=114)	42.5	63 (55.3)	41 (36.0)	10 (10.0)	51 (46.0)	0.516	1.16	0.76 - 1.78				
HSIL (n=107)	44.5	51 (47.7)	40 (37.4)	16 (16.0)	56 (53.4)	0.507	0.86	0.56 - 1.15				
ICC (n=20)	55.0	11 (55.0)	9 (45.0)	-	9 (45.0)	0.821	1.15	0.46 - 2.85				

A, alelo Arg; P, alelo Pro; P, *Pearson coefficient*; OR, *Odds Ratio*; IC, Intervalo de confiança.

Teste χ^2 foi efectuado para genótipo Arg/Arg vs portador do alelo Pro.

O quadro IV mostra a distribuição dos três genótipos de acordo com a infecção por HPV. Em 534 amostras testadas para a presença de HPV de alto-risco, não foi encontrada qualquer associação do polimorfismo R72P entre os casos HPV negativos vs positivos ($p=0.738$). O mesmo resultado foi verificado na análise dos casos positivos vs negativos para HPV16 ($p=0.826$). Estes resultados parecem assim evidenciar que na nossa população não existe associação entre os genótipos do codão 72 da p53 e a infecção por HPV.

Quadro IV. Associação entre genótipos R72P e infecção por HPV

Infecção por HPV	AA	AP	PP	Portador de P	P
	n (%)	n (%)	N (%)	n (%)	
HPV alto-risco (n=534)					
Negativo (n=289)	154 (53.3)	109 (37.7)	26 (9.0)	135 (46.7)	0.738
Positivo (n=245)	127 (51.8)	95 (38.8)	23 (9.4)	118 (48.2)	
HPV16 (n=447)					
Negativo (n=375)	198 (52.8)	142 (37.9)	35 (9.3)	177 (47.2)	0.826
Positivo (n=72)	37 (52.6)	30 (41.7)	5 (6.9)	35 (47.4)	

A, alelo Arg; P, alelo Pro; P, Pearson coefficient.

Teste χ^2 foi efectuado para genótipo Arg/Arg vs portador do alelo Pro.

O método de Kaplan-Meier permitiu analisar a influência do polimorfismo R72P na mediana da idade de aparecimento de LSIL, HSIL, tendo-se comparado as curvas pelo teste log-rank. A análise feita, comparando genótipo Arg/Arg vs portadores de Pro, não revelou nenhum tipo de associação significativa ($p=0.674$, $p=0.810$ e $p=0.928$, respectivamente) – Figuras 18 A, B e C. Do mesmo modo, quando consideradas todas as lesões em conjunto ou todas as lesões incluindo cancro do colo do útero invasivo, não foram observadas diferenças na mediana da idade ($p=0.789$ e $p=0.835$, respectivamente) – Figuras 18 D e E. Além disso, observou-se que os genótipos da p53 não têm qualquer

influência na idade para a qual ocorre a progressão de SIL para ICC ($p=0.371$) – Figura 18 F.

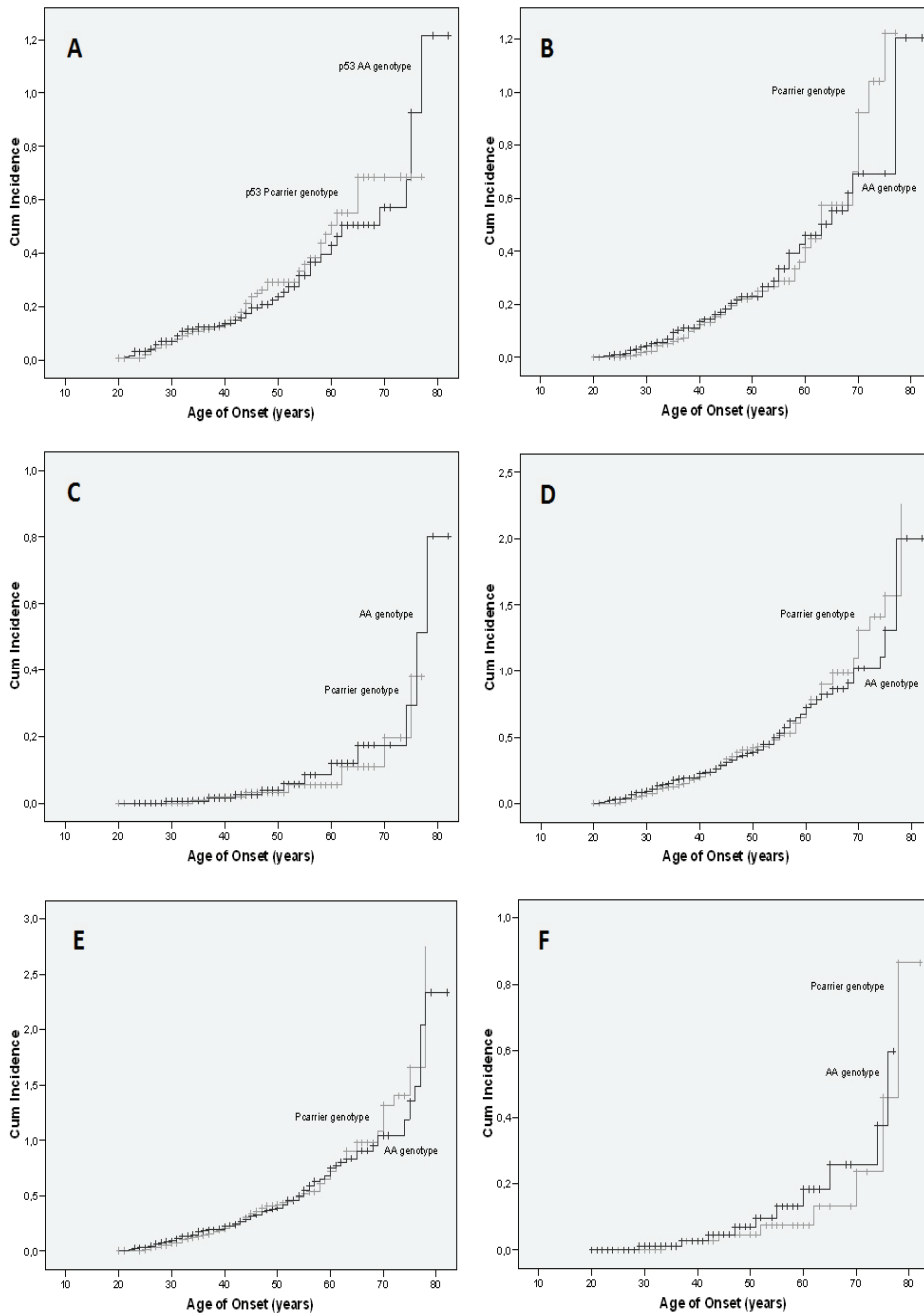


Figura 18. Curvas de Kaplan–Meier e teste log-rank, referentes à associação entre os genótipos do codão 72 da p53 e idade de aparecimento de LSIL (A), HSIL (B), ICC (C) e todas as lesões pre-invasivas (D) ou todas as lesões incluindo cancro do colo do útero invasivo (E); e para progressão entre SIL e ICC (F).

2. ANÁLISE DO POLIMORFISMO C1236G NO GENE *53BP1*

Da totalidade das nossas amostras, 434 tinham sido previamente testadas para a presença dos tipos de HPV de alto-risco pelo método de Captura Híbrida (*Digene Corporation, Gaithersburg, USA*), obtendo-se 171 casos com resultado positivo. Igualmente, 357 casos tinham sido testados para a presença de HPV16 sendo 43 positivos.

Das 700 amostras iniciais foi possível analisar 575 amostras de raspagens cervico-vaginais para o polimorfismo C1236G incluindo 290 casos de mulheres sem lesão/cancro do colo do útero (N) 82 lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL), 89 lesões intraepiteliais de alto-grau incluindo carcinoma *in situ* (HSIL) e 14 carcinomas invasivos do colo do útero (ICC).

A distribuição dos genótipos C1236G do gene *53BP1* e as frequências obtidas estão representadas no quadro V. A análise estatística revelou não existirem quaisquer diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos do polimorfismo C1236G no gene *53BP1* e os diferentes grupos citológicos ($p=0.205$).

Quadro V – Distribuição dos genótipos C1236G entre os casos sem lesão e casos com lesão/carcinoma invasivo colo do útero

Classificação citológica	Idade mediana	GG	GC	CC	Portador de C
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
N (n=290)	45.0	103 (35.5)	136 (46.9)	51 (17.6)	187 (64.5)
Todas as lesões (n=185)	44.0	82 (44.3)	76 (41.1)	27 (14.6)	103 (55.7)
LSIL (n=82)	42.5	39 (47.6)	33 (40.2)	10 (12.2)	43 (52.4)
HSIL/CIS (n=89)	44.5	38 (42.7)	37 (41.6)	14 (15.7)	51 (57.3)
ICC (n=14)	55.0	5 (35.7)	6 (42.9)	3 (21.4)	9 (64.3)

O quadro VI apresenta a distribuição dos alelos C1236G de acordo com a infecção por HPV de alto-risco, não tendo sido encontrada qualquer diferença estatisticamente significativa ($p=0.420$). Do mesmo modo, nos casos testados para a presença de HPV16, não se encontrou qualquer associação ($p=0.285$). Os resultados obtidos revelaram assim que na população em estudo parece não existir nenhum tipo de associação entre o polimorfismo C1236G no gene *53BP1* e a infecção por HPV.

Quadro VI – Associação entre genótipos C1236G e infecção por HPV

Infecção por HPV	GG	GC	CC	Portador de C	<i>P</i>
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
HPV alto-risco (n=434)					
Negativo (n=363)	96 (36.5)	122 (46.4)	45 (17.1)	196 (62.4)	0.420
Positivo (n=171)	69 (40.4)	76 (44.4)	26 (15.2)	117 (60.6)	
HPV16 (n=357)					
Negativo (n=314)	129 (41.1)	137 (43.6)	48 (15.3)	185 (58.9)	0.285
Positivo (n=43)	14 (32.6)	23 (53.5)	6 (14.0)	29 (67.4)	

P, Pearson coefficient.

Teste χ^2 foi efectuado para portador do alelo C vs genótipo GG.

Quando analisado o risco de progressão para lesões de alto-grau entre os diferentes genótipos C1236G, não foram encontradas diferenças significativas ($p=0.432$). Porém, sob o efeito genético do alelo C, verificou-se que a infecção por HPV16 aumenta o risco de progressão para HSIL [$p=0.00002$; OR=5.6 (2.4-13.3)]. Contrariamente, tal não foi observado sob o efeito genético do genótipo GG ($p=0.299$) – Quadro VII.

Quadro VII – Risco de progressão para lesões de alto-grau na presença de infecção por HPV16 entre os diferentes genótipos C1236G

	N/LSIL	HSIL/CIS	<i>P</i>	OR	95% IC
	n (%)	n (%)			
Portador de C					
HPV 16 negativo	149 (92.5)	31 (68.9)	0.0002	5.6	2.4 - 13.3
HPV 16 positivo	12 (7.5)	14 (31.1)			
GG					
HPV 16 negativo	95 (93.1)	31 (86.1)	0.299	-	-
HPV 16 positivo	7 (6.9)	5 (13.9)			

P, Pearson coefficient; OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de confiança.

Teste χ^2 foi efectuado para positividade/negatividade para a infecção por HPV16.

3. ANÁLISE DO POLIMORFISMO G5557A NO GENE *ATM*

Pelo método de Captura Híbrida (*Digene Corporation, Gaithersburg, USA*), 443 dos nossos casos tinham sido previamente testados para a presença dos tipos de HPV de alto-risco tendo-se obtido 176 casos com resultado positivo. Igualmente, 366 casos tinham sido testados para a presença de HPV16 sendo 46 positivos.

No estudo do polimorfismo G5557A foram analisadas 484 amostras de raspagens cervico-vaginais incluindo 292 casos de mulheres sem lesão/cancro do colo do útero (N) 86 lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL), 92 lesões intraepiteliais de alto-grau incluindo carcinoma *in situ* (HSIL) e 14 carcinomas invasivos do colo do útero (ICC).

O quadro VIII mostra a distribuição dos genótipos G5557A do gene *ATM* e as frequências obtidas. A análise estatística revelou não existirem quaisquer diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos do polimorfismo G5557A no gene *ATM* e os diferentes grupos citológicos ($p=0.123$).

Quadro VIII – Distribuição dos genótipos G5557A entre os casos sem lesão/cancro do colo do útero e casos com lesão/cancro do colo do útero

Classificação citológica	Idade mediana	GG	GA	AA	Portador de A
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
N (n=292)	45.0	202 (69.2)	83 (28.4)	7 (2.4)	90 (30.8)
Todas as lesões (n=192)	44.0	145 (75.5)	42 (21.9)	5 (2.6)	5 (2.6)
LSIL (n=86)	42.5	69 (80.2)	13 (15.1)	4 (4.7)	17 (19.8)
HSIL/CIS (n=92)	44.5	64 (69.9)	27 (29.3)	1 (1.1)	28 (30.4)
ICC (n=14)	55.0	12 (85.7)	2 (14.3)	-	2 (14.3)

A distribuição dos alelos G5557A de acordo com a infecção por HPV é descrita no quadro IX. Do mesmo modo não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p=0.975$). Igualmente, nos casos testados para a presença de HPV16, não se encontrou qualquer associação ($p=0.586$). Estes resultados revelaram que na população em estudo parece não existir qualquer associação entre o polimorfismo G5557A no gene *ATM* e a infecção por HPV.

Quadro IX – Associação entre os genótipos G5557A e a infecção por HPV

Infecção por HPV	GG	GA	AA	Portador de A	<i>P</i>
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
HPV alto-risco (n=443)					
Negativo (n=267)	190 (71.2)	72 (27.0)	5 (1.9)	77 (28.1)	0.975
Positivo (n=176)	125 (71.0)	44 (25.0)	7 (4.0)	51 (29.0)	
HPV16 (n=366)					
Negativo (n=320)	288 (71.3)	81 (25.3)	11 (3.4)	92 (28.8)	0.591
Positivo (n=46)	31 (67.4)	15 (32.6)	-	15 (32.6)	

P, Pearson coefficient.

Teste χ^2 foi efectuado para portador do alelo A vs genótipo GG.

Quando analisado o risco de progressão de lesões de baixo-grau para lesões de alto-grau ou carcinoma invasivo para os diferentes genótipos G5557A, não foram encontradas diferenças significativas ($p=0.171$) – Quadro X.

Quadro X – Genótipos G5557A e risco de progressão entre lesões de baixo-grau e lesões de alto-grau ou carcinoma invasivo do colo do útero

Classificação citológica	GG	Portador de A	<i>P</i>
	n (%)	N (%)	
LSIL (n=86)	69 (80.2)	17 (19.8)	0.171
≥HSIL (n=106)	76 (71.7)	30 (28.3)	

P, Pearson coefficient;

Teste χ^2 foi efectuado para portador do alelo A vs genótipo GG.

O método de Kaplan-Meier permitiu avaliar a influência do polimorfismo G5557A na idade mediana de aparecimento de LSIL, HSIL e ICC. Verificou-se que o alelo 5557A

exerce influência na idade à qual ocorre a progressão de lesões de baixo-grau para lesões de alto-grau ou carcinoma invasivo. A idade mediana para aparecimento de lesões de alto-grau ou carcinoma invasivo nos portadores do alelo A foi de 43.0 anos comparando com os 59.0 anos observados nas mulheres homocigóticas para o alelo G ($p=0.001$) – Figura 19.

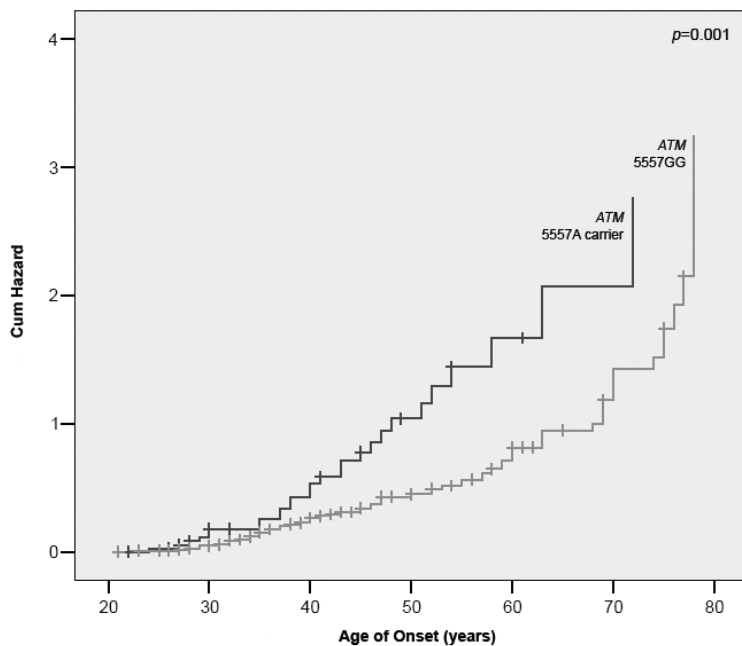


Figura 19 – Curvas de Kaplan–Meier e teste log-rank referentes à associação entre genótipos G5557A e idade das mulheres com LSIL e com HSIL/ICC.

DISCUSSÃO



Desde que se atribuiu ao cancro uma forte componente genética tornou-se indispensável, de modo a compreendê-lo ao nível molecular, a identificação dos genes cujas mutações podem contribuir para o seu desenvolvimento.

Os genes *TP53*, *53BP1* e *ATM* como intervenientes fulcrais do ciclo celular têm-se revelado uma fonte inesgotável de investigação para a comunidade científica, não havendo ainda uma opinião sólida quanto à contribuição destes genes e das suas variações polimórficas na susceptibilidade para diferentes neoplasias. Neste trabalho avaliou-se a influência de polimorfismos nestes genes críticos do ciclo celular na susceptibilidade para lesões/cancro do colo do útero.

O cancro do colo do útero é a neoplasia mais frequente nas mulheres de países desenvolvidos, constituindo cerca de 25% de todos os cancros femininos (Burd, 2003). Os HPVs de alto-risco têm sido reconhecidos como os agentes etiológicos desta neoplasia, devendo-se a grande maioria destes casos à infecção pelo HPV do tipo 16 (Medeiros *et al.*, 2005). A integração do DNA viral na célula hospedeira está claramente associada a lesões severas e carcinomas invasivos. Como resultado, dá-se o aumento de expressão das proteínas virais E6 e E7, as quais por sua vez, têm elevada afinidade para a p53 e pRb respectivamente. Esta interacção põe fim ao normal funcionamento destas proteínas, resultando numa proliferação aumentada e instabilidade genómica que conduzem à acumulação de erros no DNA pela célula hospedeira, erros estes que não podem ser reparados.

A primeira fase do trabalho centrou-se na análise do polimorfismo no gene *TP53*. Estudos anteriormente publicados sugeriram que a p53 aparece sob duas formas polimórficas, codificando ou uma prolina (P) ou uma arginina (R) no codão 72. Estas duas formas distintas têm diferentes propriedades biológicas e bioquímicas, o que poderá influenciar na interacção com a proteína E6 dos HPVs de alto-risco. Storey e

colaboradores mostraram que mulheres homozigóticas para o alelo Arg eram mais susceptíveis ao desenvolvimento de cancro do colo do útero do que as mulheres heterozigóticas ou as homozigóticas para o alelo Pro, concluindo assim que este polimorfismo poderia estar envolvido na carcinogénese do colo do útero (Storey *et al.*, 1998). Contudo, o presente estudo revelou não existir risco aumentado para o genótipo Arg/Arg nos diferentes grupos citológicos ($p=0.336$). Este resultado veio de encontro com os estudos mais recentes, incluindo aqueles que usaram sangue (Humbey *et al.*, 2002) ou células cervico-vaginais (Abba *et al.*, 2003) como amostra.

Foi também analisada na nossa amostragem, a influência do polimorfismo R72P nos casos positivos e negativos para HPVs de alto-risco e nomeadamente para HPV16. De acordo com outros estudos já publicados (Abba *et al.*, 2003), não foram encontradas quaisquer diferenças significativas ($p=0.794$ e $p=0.877$ respectivamente). Estes resultados revelaram que a amostragem estudada não há associação entre os genótipos do codão 72 da p53 e a infecção por HPV. Assim, este polimorfismo parece não afectar o desenvolvimento quer de lesões intraepiteliais quer de cancro do colo do útero, independentemente da infecção por HPV especialmente por HPV16.

Além das várias metodologias usadas em cada estudo, as diferenças encontradas para a influência do polimorfismo R72P na infecção por HPVs de alto-risco e na classificação citológica, nomeadamente nos indivíduos Indianos e Africanos, poderá ser explicada pelas variações étnicas e geográficas destas populações (Beckman *et al.*, 1994; Sousa *et al.*, 2007).

Igualmente, quando analisada a influência deste polimorfismo na idade de aparecimento de LSIL, HSIL e ICC, nenhuma associação foi encontrada, comparando genótipo Arg/Arg vs portadores de Pro ($p=0.674$, $p=0.810$ e $p=0.928$, respectivamente).

Numa segunda fase do trabalho analisou-se um polimorfismo no gene *53BP1*. A proteína codificada por este gene, a p53BP1, tem uma função crucial como regulador da estabilidade genómica, nomeadamente na resposta celular a quebras da dupla hélice do DNA. Contudo, a sua verdadeira função no ciclo celular e o modo como actua na sinalização das quebras da dupla hélice do DNA é ainda alvo de discussão.

Vários polimorfismos foram recentemente identificados no gene *53BP1*. Uma das variantes mais bem estudadas consiste numa transição de uma Citosina (C) para Guanina (G), no nucleotídeo 1236 do exão 9 do gene, o que resulta numa troca do aminoácido Ácido aspártico (Asp) para Glutamina (Glu) na posição 353 da proteína (Frank *et al.*, 2005). Este polimorfismo foi recentemente associado a um aumento significativo no risco de desenvolvimento de cancro da mama em portadores do genótipo Pro/Pro da p53 (Ma *et al.*, 2006).

No presente estudo, quando analisada a influência do polimorfismo G1236C no gene *53BP1* nas diferentes classificações citológicas, não foi encontrada qualquer associação estatisticamente significativa ($p=0.205$). Do mesmo modo, quando avaliada a presença ou ausência de HPVs de alto-risco, ou de HPV16, não foram encontradas diferenças significativas ($p=0.686$ e $p=0.605$ respectivamente). Assim, na população em estudo o polimorfismo G1236C no gene *53BP1* parece não exercer influência directa no desenvolvimento de lesões/cancro do colo do útero, bem como não está associado com a infecção por HPVs de alto-risco, nomeadamente por HPV16. Todavia, é de salientar as diferentes frequências genótípicas encontradas, quando comparando com outras populações já estudadas. Na população alemã, as frequências para o grupo controlo foram respectivamente 9.9% para o genótipo GG, 42.6% para o genótipo GC e 47.6% para o genótipo CC (Frank *et al.*, 2005). Num estudo que envolveu a população chinesa estas frequências foram: 18.2%, 50.9% e 30.9% para os genótipos GG, GC e CC respectivamente (Ma *et al.*, 2006). De acordo com os resultados obtidos no

presente estudo (35.5% para o genótipo GG, 46.9% para GC e 17.6% para CC- Quadro V), poderemos sugerir que este polimorfismo esteja fortemente afectado pelas variações geográficas e étnicas. Eventualmente as variações encontradas poderão ainda ser explicadas pelas diferentes metodologias usadas em cada estudo.

Neste trabalho foi também avaliado o envolvimento do polimorfismo G1236C no gene *53BP1* no desenvolvimento/progressão de LSIL e HSIL. Embora não tenha sido encontrada nenhuma influência na idade mediana de aparecimento de lesões intraepiteliais de baixo e alto grau ($p > 0.05$), sob o efeito genético do alelo C verificou-se que a infecção por HPV16 aumenta o risco de progressão para lesões de alto-grau [$p = 0.00002$; OR=5.6 (2.4-13.3)]. O mesmo não foi observado sob efeito genético do genótipo GG ($p = 0.299$) – ver quadro VII. Perante isto, é biologicamente plausível supor que este polimorfismo terá influência na interacção da p53BP1 com a p53. Sabe-se que a p53BP1 interage com o domínio central da p53 através da sua região terminal, os domínios BRCT (Callebaut *et al.*, 1997; Bork *et al.*, 1997). Desta forma é possível que, aquando da interacção entre p53BP1 e p53, na presença da variante C que codifica para o aminoácido Ácido aspártico, a afinidade da p53 para a proteína E6 seja aumentada.

O alelo 1236C parece assim criar um ambiente mais propício à infecção por HPV16 na medida que irá tornar mais favorável a interacção entre a p53 e a proteína viral E6.

A última fase do trabalho consistiu na análise de uma variante genética no gene *ATM*. A pATM é uma cinase essencial na resposta celular aos danos do DNA e na regulação dos pontos de controlo do ciclo celular. Uma das variantes genéticas de maior importância que ocorre no gene *ATM* (G5557A) consiste numa transição de uma Guanina (G) para uma Adenina (A) no nucleotídeo 5557 (D1853N). Um estudo anterior sugeriu que o alelo A modula a penetrância da forma hereditária não-polipóide do cancro colorectal em portadores de mutações germinativas nos genes *MLH1* e *MSH2* (Maillet *et*

al., 2000). Adicionalmente, este polimorfismo foi associado a situações de radiosensibilidade em doentes com cancro da mama, sugerindo que pode representar um factor de risco na predisposição para reacções adversas após radioterapia (Angèle *et al.*, 2003). Mais recentemente, reconheceu-se este polimorfismo como tendo uma associação com o cancro de mama bilateral (Thorstenson *et al.*, 2001).

O presente estudo revelou que não há qualquer associação entre os génotipos G5557A e a classificação citológica ($p=0.123$). Igualmente, não foram encontradas diferenças quando analisada a presença ou ausência de HPVs de alto-risco, nomeadamente HPV16 ($p=0.837$ e $p=0.659$ respectivamente). Assim, na população estudada este polimorfismo parece não ter influência directa no desenvolvimento de lesões/cancro do colo do útero bem como não está associado com a infecção por HPVs de alto-risco ou por HPV16.

Os polimorfismos genéticos foram já caracterizados como tendo influência na idade de aparecimento de algumas neoplasias (Cardoso *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2007). Neste trabalho foi também alvo de análise o envolvimento do polimorfismo G5557A do gene *ATM* na idade mediana de aparecimento de LSIL, HSIL e ICC, verificando-se que o alelo A influenciava a idade para a qual ocorria a progressão de LSIL para HSIL ou ICC (figura 19). Com isto, efectuando a análise para portador de A *vs* génotipo GG, a idade mediana de aparecimento de lesões de alto-grau ou carcinoma invasivo nos portadores do alelo A foi 43.0 anos comparando com os 59.0 anos para os homozigóticos do alelo G ($p=0.001$).

Estudos anteriores mostraram que o polimorfismo G5557A afecta um local de *splicing*, sugerindo uma possível alteração no *splicing* normal do exão 9 do gene *ATM* (Tapia *et al.*, 2007; Thorstenson *et al.*, 2001; Thorstenson *et al.*, 2003). Consequentemente, pode haver uma modificação na resposta ao DNA danificado, que levará ao aumento da instabilidade genética, favorecendo a carcinogénese. Além disto,

sabe-se que em situações de HSIL e ICC, o genoma viral está frequentemente integrado no genoma da célula hospedeira, fazendo com que este seja um evento de extrema importância no desenvolvimento do cancro do colo do útero (Pett e Coleman, 2007 ; zur Hausen, 1996). Considerando estes dados e tendo em conta que o gene *ATM* é activado após a exposição do DNA a agressores, nomeadamente aqueles que introduzem quebras de dupla hélice no DNA, parece fazer algum sentido o facto de que o alelo 5557A tenha influência apenas na idade a que ocorre transformação das lesões de baixo-grau para alto-grau ou carcinoma invasivo.

***CONCLUSÕES E
PERSPECTIVAS
FUTURAS***



É sabido que tanto os eventos neoplásicos iniciais como os tardios (crescimento, inversão, metastização, resposta à terapêutica e finalmente, sobrevivência) são fortemente afectados pelo *background* genético de cada indivíduo. A presença de milhões de genes polimórficos no genoma humano leva a uma extensa variação genética que afecta tanto os mecanismos fisiológicos normais como a patogénese do cancro (Loktionov, 2004).

Vários estudos já publicados, nomeadamente pelo nosso grupo, definem os polimorfismos como factores de risco para o desenvolvimento de cancro (Medeiros *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2004; Pinto-Correia *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2006).

O gene *TP53* tem sido um dos mais bem estudados, uma vez que mutações neste gene figuram em mais de 50% dos tumores humanos. Relativamente ao polimorfismo no codão 72 da p53, parece não exercer qualquer tipo de influência no desenvolvimento de lesões/cancro do colo do útero. Estes resultados, que vieram de encontro com outros já publicados, permitem assim considerar o uso de células cervico-vaginais para análises moleculares de forma a estabelecer o papel dos marcadores genéticos na susceptibilidade para a infecção por HPV, persistência e desenvolvimento de cancro.

A p53BP1 é considerada um importante regulador da estabilidade genómica, mais propriamente na resposta celular a quebras da dupla hélice do DNA. A associação entre as variantes polimórficas do gene *53BP1* e a predisposição aumentada para cancro foi já estabelecida (Ma *et al.*, 2005). Porém, tanto quanto se sabe, até à data não há estudos que avaliem o efeito dos polimorfismos no gene *53BP1* e o desenvolvimento de lesões/cancro do colo do útero. O presente estudo demonstrou pela primeira vez que o a infecção por HPV16 influencia a progressão para HSIL nos portadores do alelo 1236C.

Este resultado poderá assim, em parte, explicar o facto de que apenas algumas infecções por HPV16 vão persistir e progredir para lesões avançadas e cancro invasivo.

A proteína codificada pelo gene *ATM* tem um papel de extrema importância na manutenção da integridade do genoma, sendo que mutações neste gene foram já descritas como tendo influência no desenvolvimento de alguns tipos de neoplasias. O presente estudo revelou, pela primeira vez, um envolvimento do polimorfismo G5557A no desenvolvimento do cancro do colo do útero. Pelo menos na nossa população, o alelo 5557A do gene *ATM* parece ter um papel importante na idade para a qual ocorre transformação celular de lesões de baixo-grau para lesões alto-grau ou carcinoma invasivo.

Além da influência das variações genéticas nos genes *TP53*, *53BP1* e *ATM* na susceptibilidade para cancro, pretendemos alargar o estudo à área da farmacogenómica com o intuito de avaliar o papel destes polimorfismos na resposta à terapia, contribuindo assim para uma definição personalizada do tratamento do cancro.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***



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

- Anderson L, Henderson C, Adachi Y. Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. *Mol Cell Biol.* 2001;21:1719-29.

- Angèle S, Falconer A, Edwards SM, Dork T, Bremer M, Chapot B, et al. ATM polymorphisms as risk factors for prostate cancer development. *Br J Cancer.* 2004;91:783-7.

- Angèle S, Romestaing P, Moullan N, Vuillaume M, Chapot B, Friesen M, et al. ATM haplotypes and cellular response to DNA damage: association with breast cancer risk and clinical radiosensitivity. *Cancer Res.* 2003;63:8717-25.

- Alarcon-Vargas D and Ronai Z. p53-Mdm2- the affair that never ends. *Carcinogenesis.* 1992;23:541-7.

- Arends Mj, Buckley CH, Weels M. Aetiology, pathogenesis and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol.* 1998;51:96-103.

- Axelrod R, Axelrod D, Pienta KJ. Evolution of cooperation among tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:13474-9.

- Bakkenist CJ and Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature.* 2003;421:499-506.

- Beckman G, Birgander R, Sjalander A, Saha N, Holmberg PA, Kivela A, Beckman L. Is p53 polymorphism maintained by natural selection?. *Hum Hered.* 1994;44:266-70.

- Bode AM and Dond Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.*2004;4:793-805.

- Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald AF, Altschul SF, Koonin EV. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J.* 1997;11:68-76.

- Bosh FX, Manos MM, Muñoz N, Scheman M, Jansen AM, Peto J et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective international biological study on cervical cancer (IBSCC) study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:958-61.

- Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene.* 1999;234:177-86.

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

- Butel JS. Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis.* 2000;21:405-26.

- Capasso LL. Antiquity of Cancer. *Int J Cancer.* 2004;113:2-13.

- Callebaut I and Morion Jean-Paul. From BRCA1 to RAP1 a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Letters.* 1997;400:25-30.

- Cardoso C, Araújo H, Cruz E, Afonso A, Mascarenhas C, Almeida S, et al. Haemochromatosis gene (HFE) mutations in viral-associated neoplasia: Linkage to cervical cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;341:232-8.

- Carrillo-Infante C, Abbadessa G, Bagella L, Giordano A. Viral infections as a cause of cancer (review). *Int J Oncol*. 2007;30:1521-8.

- Chen G and Lee EYHP. The product of the ATM gene is a 370-kDa nuclear phosphoprotein. *J Biol Chem*. 1996;271:33693-7.

- Costa S, Pinto D, Pereira D, Rodrigues E, Cameselle-Teijeiro J, Medeiros R, et al.. DNA repair polymorphisms might contribute differentially on familial and sporadic breast cancer susceptibility: a study on a Portuguese population. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;103:209-17.

- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324:17-27.

- Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the α_6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*. 1997;71:2449-56.

- Farrel PJ. Tumor viruses – could they be an Achilles` hell of cancer?. *Eur J Cancer*. 2002;38:1815-6.

- Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*. 2007;18:581-592.

- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide IARC CancerBase No. 5, version 2.0. IARC Press, Lyon. 2004.

- Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ*. 2001;164:1017-25.

- Franco EL, Rohan TE, Villa LL. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91:506-511.

- Frank B, Hemminki K, Bermejo JL, Klaes R, Bugert P, Wappenschmidt B et al. TP53-bonding protein variants and breast cancer risk: a case-control study. *Breast Cancer Res*. 2005;7:R502-5.

- Furumoto H and Irahara M. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. *J Med Invest*. 2002;49:124-33.

- Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charrmley P, Concannon P, et al. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature*. 1988;336:577-80.

- Giroglou T, Floril L, Schäfer F, Streek RE, Sapp M. Requires cell surface heparin sulphate. *J virol*. 2001; 75:1567-70.

- Gorgoulis VG, Vassilou L, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T et al. Activation of DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*. 2005;434:907-13.

- Grassman K, Rapp B, Maschek H, Petry KU, Iftner T. Identification of a differentiation-Inducible Promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol.* 1996;70:2339-49.

- Hanahan D and Weinberg A. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.

- Hahn W, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumor cells with defined genetic elements. *Nature.* 1999;400:464-7.

- Hebner CM and Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol.* 2006;16:83-97.

- Heikkinen K, Rapakko K, Karppinen SM, Erkkö H, Nieminen P, Winqvist R. Association of common ATM polymorphism with bilateral breast cancer. *Int J Cancer.* 2005;116:69-72.

- Houtgraaf JH, Vermissen J, Giessen WJ. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revasc Med.* 2006;7:165-172.

- Howley PM, Ganem D, Kieff E. DNA viruses. In *Cancer, Principles & Practice of Oncology*, 7th edition. De Vita V, Hellman S, Rosenberg AS eds. Philadelphia. 2001;pp:175-9.

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

- Iwabuchi K, Bartel L, Li B, Marracino R, Fields S. Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:6098-102.

- Iwabuchi K, Basu BP, Kysela B, Kurihara T, Shibata M, Guan D et al. Potencial role for 53BP1 in DNA end-joining repair through direct interaction with DNA. *J Biol Chem*. 2003;38:36487-95.

- Iwabuchi K, Li B, Massa HT, Trask BJ, Date T, Fields S. Stimulation of p53-mediated transcriptional activation by the p53-binding proteins, 53BP1 and 53BP2. *J Biol Chem*. 1998;273:26061-8.

- Jowsey P, Morrice NA, Hastie CJ, McLauchlan H, Toth R, Rouse J. Characterisation of the sites of DNA damage-induced 53BP1 phosphorylation catalysed by ATM and ATR. *DNA Repair*. 2007;6:1536-44.

- Kaufmann WK and Paules RS. DNA damage cell cycle checkpoints. *FASEB J*. 1996;10:238-47.

- Khanna KK and Chenevix-Trench G. ATM and genome maintenance: defining its role in breast cancer susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2004;9:247-62.

- Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, Mulhern TD. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ*. 2001;8:1052-65.

- Lane DP. Cancer: p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358:15-6.

- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88:323-31.

- Loktionov A. Common gene polymorphisms, cancer progression and prognosis. *Cancer Lett.* 2004;208:1-33.

- Lukas J, Lukas C, Barkett J. Mammalian cell cycle checkpoints:signaling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair.* 2004;3:997-1007.

- Ma H, Hu Z, Zhai X, Wang S, Wang X, Qin J et al. Joint effects of single nucleotide polymorphism in P53BP1 and P53 on breast cancer risk in a chinese population. *Carcinogenesis.* 2006;4:766-71.

- Maillet P, Chappuis PO, Vaudan G, Dobbie Z, Hutter P, Sappino AP. A polymorphism in the ATM gene modulates the penetrance of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2000; 88:928-31.

- Maillet P, Vaudan G, Chappuis P, Sappino A. PCR-mediated detection of a polymorphism in the ATM gene. *Mol Cell Probes.* 1999;13:67-9.

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

- Medeiros R, Prazeres H, Pinto D, Macedo-Pinto I, Lacerda M, Lopes C, Cruz E. Characterization of HPV genotype profile in squamous cervical lesions in Portugal, a southern European population at high risk of cervical cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2005;14:467-71.

- Medeiros R, Soares R, Vasconcelos A, Schmitt F, Lopes C. Glutathione S-transferase genotype GSTM1 as a predictor of elevated angiogenic phenotype in patients with early onset breast cancer. *Angiogenesis*. 2004;7:53-58.

- Meier M, den Boer ML, Hall AG, Irving JA, Passier M, Minto L et al. Relation between genetic variants of the ataxia telangiectasia-mutated (ATM) gene, drug resistance, clinical outcome and predisposition to childhood T-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*. 2005;19:1887-95.

- Meulmeester E, Pereg Y, Shiloh Y, Jochemsen AG. ATM-mediated phosphorylations inhibit Mdmx/Mdm2 stabilization by HAUSP in favor of p53 activation. *Cell Cycle*. 2005;4:1166-70.

- Michor F, Iwasa Y, Nowak MA. Dynamics of cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:197-205.

- Mitra S, Singh R, Panda C, Royhouthury S. Association of specific genotype and haplotype of p53 gene with cervical cancer in India. *J Clin Pathol*. 2005;58:26-31.

- Mochan TA, Venere M, DiTullio Jr RA, Halazonetis TD. 53BP1, an activator of ATM response to DNA damage. *DNA Repair*. 2004;3:945-52.

- Mochan TA, Venere M, DiTullio Jr RA, Halazonetis TD. 53BP1 and NFB1/MDC1-Nbs1 function in parallel interacting pathways activating Ataxia-Telangiectasia Mutated (ATM) in response to DNA damage. *Cancer Res*. 2003;63:8586-91.

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

- Pett M, Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis?. *J Pathol*. 2007; 212:356-67.

- Pinheiro PS, Tyczynski JE, Bray F, Amado J, Matos E, Parkin DM. Cancer incidence and mortality in Portugal. *Eur J Cancer*. 2003;39:2507-20.

- Pinto-Correia AL, Sousa H, Fragoso M, Moreira-Dias L, Lopes C, Medeiros R et al. Gastric cancer in a Caucasian population: role of pepsinogen C genetic variants. *World J Gastroenterol*. 2006;12:5033-6.

- Pinto D, Vasconcelos A, Costa S, Pereira D, Rodrigues H, Lopes C et al. HER2 polymorphism and breast cancer risk in Portugal. *Eur J Cancer Prev*. 2004;13:177-81.

- Rappold I, Iwabuchi K, Date T, Chen J. Tumor suppressor p53 Binding Protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *J Cell Biol*. 2001;153:613-9.

- Reed SI. Cell Cycle. In *Cancer, Principles & Practice of Oncology*, 7th edition. De Vita V, Hellman S, Rosenberg AS eds. Philadelphia. 2001;pp:83-91.

- Romanczuk H and Howley PT. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:3159-63.

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

- Santos AM, Sousa H, Pinto D, Portela C, Pereira D, Catarino R et al. Linking TP53 codon 72 and P21 nt590 genotypes to the development of cervical and ovarian cancer. *Eur J Cancer.* 2006;42: 958-63.

- Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Cell cycle, Checkpoints Mechanisms and Genotoxic Stress. *Environ Health Perspec.* 1999;107:5-15.

- Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:155-68.

- Slee A, O'connor D, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide?. *Oncogene.* 2004;23:2809-18.

- Soultz N, Sourvinos G, Dokianakis DN. P53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Letters.* 2002;179:175-83.

- Sousa H, Santos AM, Catarino R, Pinto D, Vasconcelos A, Lopes C, Breda E, Medeiros R. Linkage of TP53 codon 72 pro/pro genotype as predictive factor for nasopharyngeal carcinoma development. *Eur J Cancer Prev.* 2006;15:362-6.

- Sousa H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R. Is the p53 codon 72 polymorphism a key biomarker for cervical cancer development? A meta-analysis review within European populations. *Int J Mol Med*. 2007;[Epub ahead of print].

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

- Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and late phases. *Cancer Biology*. 1999;9:379-86.

- Tapia T, Sanchez A, Vallejos M, Alvarez C, Moraga M, Smalley S, et al. ATM allelic variants associated to hereditary breast cancer in 94 Chilean women: susceptibility or ethnic influences?. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;[Epub ahead of print].

- Thorland EC, Myers SL, Gustout BS, Smith DJ. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integration in cervical cancer tumours. *Oncogene*. 2003;22:1225-37.

- Thorstenson YR, Roxas A, Kroiss R, Jenkins MA, Yu KM, Bachrich T, Muhr D, et al. Contributions of ATM mutations to familial breast and ovarian cancer. *Cancer Res*. 2003;63:3325-33.

- Thorstenson YR, Shen P, Tusher VG, Wayne L, Davis R, Chu G, et al. Global analysis of ATM polymorphism reveals significant functional constraint. *Am J Hum Genet*. 2001; 69:396-412.

-
- Tommasino M, Acardi R, Caldeira S, Dong W, Malanchi I, Smet A et al. The role of TP53 in cervical carcinogenesis. *Hum Mutat.* 2003;21:307-12.

 - Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000;408:307-10.

 - Wang B, Matsuoka S, Carpenter PB, Elledge SJ. 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science.* 2002;298:1435-8.

 - Weber BL. Cancer genomics. *Cancer Cell.* 2002;1:37-47.

 - Weston A, Pan FC, Ksieski HB, Wallestein S, Berkowitz GS, Tarter PI et al. p53 haplotype determination in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent.* 1997;6:105-12.

 - Woodman C, Collins SI, Ypung LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev.* 2007;7:11-22.

 - Zgheib O, Huyen Y, Ditullio Jr RA, Snyder A, Venere M, Stavridi ES, et al. ATM signaling 53BP1. *Radiotherapy and Oncology.* 2005;119-22.

 - Zheng ZM and Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.*2006;11:2286-302.

 - zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev.* 2002;2:342-50.

 - zur Hausen H. Papillomaviruses causin cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Can Inst.* 2000;92:690-6.

- zur Hausen H. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1288:55-78.

- <http://www.edu.aragob.es/>

- <http://www.expertreviews.org/>

- <http://ghr.nlm.nih.gov/>

- <http://www.merkmedicus.com/>

- <http://www.science.kennesaw.edu/>

- <http://www.static.flickr.com/>

