

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DE ABEL SALAZAR

ALTERAÇÕES NO GENE p73
EM CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO

ROGÉRIA MARIA CRAVEIRO PEREIRA

2003

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR

**ALTERAÇÕES NO GENE p73
EM CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO**

Orientador: Professora Doutora Maria de los Angeles Martínez de Pancorbo

Co-orientador: Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva

ROGÉRIA MARIA CRAVEIRO PEREIRA

2003

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO	8
1.2. HPV E CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO	10
1.3. CO-FACTORES NO CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO	13
1.4. O CICLO CELULAR, O p53 E O p73	16
1.5. A RESPOSTA À RADIAÇÃO, O p53 E O p73	23
1.6. POLIMORFISMOS GENÉTICOS E O GENE p73	27
1.7. PERDA DE HETEROZIGOTIA	28 32
^{Hipótese} 2. OBJECTIVO	30 33
3. MATERIAL E MÉTODOS	30 34
4. RESULTADOS	32 36
5. DISCUSSÃO	37 41
^{Finalis} 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	42 46
7. BIBLIOGRAFIA	45 48
8. ANEXO ¹¹¹	54 58

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE
MESTRE APRESENTADA AO INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR DA
UNIVERSIDADE DO PORTO

AGRADECIMENTOS

A Expressão do meu sincero agradecimento:

Ao Professor Doutor José Eduardo Lima Pinto da Costa, pela realização e dinamização do Mestrado em Medicina Legal.

À professora Doutora Maria José Carneiro de Sousa, pelo incentivo durante a realização deste trabalho e pela dinamização do Mestrado em Medicina Legal.

À Professora Doutora Maria de Fátima Terra Pinheiro, pelo constante incentivo e empenhamento na prossecução deste trabalho.

À Professora Doutora Maria de los Angeles Martínez de Pancorbo, pelo incentivo e orientação na elaboração desta tese.

Ao Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva, pela orientação dos trabalhos laboratoriais, pelo incentivo e empenhamento constantes na realização desta tese e pela contribuição para o meu interesse nesta área de estudo.

RESUMO

A infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) é essencial na carcinogénese do carcinoma do colo do útero. No entanto é necessário que exista uma interrelação complexa entre os genes virais e os celulares para a desregulação do controlo do ciclo celular e o desenvolvimento e progressão do carcinoma do colo do útero. O gene *p73* está localizado na região 1p36.3, que frequentemente sofre deleção com perda de heterozigotia (*loss of heterozygosity*, LOH) nos tumores humanos. No presente trabalho analisámos o polimorfismo C/T do gene *p73* e a LOH no mesmo locus, por PCR-RFLP em 134 amostras de ADN de 67 biópsias de carcinomas primários do colo do útero pré tratamento e das amostras correspondentes de sangue periférico. As frequências dos genótipos foram de 56.7% para o genótipo homozigótico GC/GC e 43.3% para o genótipo heterozigótico GC/AT. A presença do genótipo GC/AT nos tumores esteve associada a idade inferior à data da menarca ($p = 0.039$) e a elevada paridade ($p = 0.015$). Em 20.0% das amostras de ADN de tumor verificou-se a perda do alelo AT, em comparação com o ADN normal da amostra de sangue periférico respectiva. O alelo AT manteve-se nas doentes com elevada paridade ao contrário do grupo com baixa paridade em que a perda do alelo AT no ADN do tumor ocorreu em 33.3% das doentes ($p = 0.041$). Estes resultados sugerem que as alterações genéticas em *p73* podem contribuir para a génese e/ou progressão do carcinoma do colo do útero na zona de transformação infectada por HPV e sujeitas a exposição prolongada das variações hormonais associadas com a gravidez.

RESUMÉ

L'infection par les papillomavirus humains (HPV) est essentielle dans la carcinogenèse du cervix utérin. Cependant une interdépendance complexe entre les gènes viraux et cellulaires est nécessaire pour la déréglementation de commande du cycle cellulaire le développement, et la progression du cancer du cervix utérin. Le gène *p73*, localisé dans la région 1p36.3 est souvent supprimée par la perte de l'hétérozigotie (*loss of heterozygosity* - LOH) dans les cancers humains. Nous avons analysé le polymorphisme CT, et de LOH dans ce locus, par la PCR-RFLP dans 134 échantillons d'ADN provenant des biopsies de 67 tumeurs primaires avancées du cervix non traitées, et du sang périphérique correspondant. On a observé des fréquences génotypiques de 56.7% pour le génotype homozygotique GC/GC et de 43.3% pour le génotype hétérozygotique GC/AT. La présence du génotype GC/AT dans les tumeurs a été associée au jeune âge du ménarche ($p = 0.039$) et à la parité élevée ($p = 0.015$). Dans 20.0% d'échantillons d'ADN de tumeur l'allèle AT a été perdu par rapport à la paire d'ADN normal du sang. L'allèle AT a été conservé chez les femmes à parité élevée. Au contraire, dans le groupe à basse parité, 33,3% de patientes ont perdu l'allèle AT dans l'ADN tumoral ($p = 0.041$). Ces résultats suggèrent que les changements génétiques du *p73* puissent contribuer à la genèse et/ou à la progression du carcinome du cervix dans la zone de transformation infectée par le HPV, et soumise à l'exposition prolongée des variations hormonales liés à la grossesse.

ABSTRACT

Infection with human papillomaviruses (HPV) is essential in the carcinogenesis of the uterine cervix. However, a complex interrelation between viral and cellular genes is necessary for cell-cycle control deregulation and development and progression of cervical cancer. *p73* gene is localized in 1p36.3 region, which is often deleted by loss of heterozygosity (LOH) in human cancers. We analyzed the *p73* CT polymorphism and LOH in this locus, by PCR-RFLP in 134 DNA samples from biopsies of 67 primary untreated invasive cervix tumors and the corresponding peripheral blood. Genotype frequencies of 56.7% for homozygous genotype GC/GC and 43.3% for heterozygous genotype GC/AT were found. The presence of GC/AT genotype in tumors was associated with lower age at menarche ($p = 0.039$) and high parity ($p = 0.015$). In 20.0% of DNA tumor samples AT allele was lost in comparison to their DNA normal blood pair. AT allele was conserved in women with high parity. This was not the case in the group with low parity, with 33.3% of patients showing loss of AT allele in tumor DNA ($p = 0.041$). These results suggest that *p73* genetic alterations may contribute to the genesis and/or progression of cervical carcinoma on a HPV infected transformation zone under prolonged exposure to hormonal change events related to pregnancy.

ÍNDICE

<i>1. INTRODUÇÃO</i>	<i>7</i>
<i>1.1. CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO</i>	<i>8</i>
<i>1.2. HPV E CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO</i>	<i>10</i>
<i>1.3. CO-FACTORES NO CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO</i>	<i>13</i>
<i>1.4. O CICLO CELULAR, O p53 E O p73</i>	<i>16</i>
<i>1.5. A RESPOSTA À RADIAÇÃO, O p53 E O p73</i>	<i>23</i>
<i>1.6. POLIMORFISMOS GENÉTICOS E O GENE p73</i>	<i>27</i>
<i>1.7. PERDA DE HETEROZIGOTIA</i>	<i>32</i>
<i>2. HIPÓTESE E OJECTIVO</i>	<i>33</i>
<i>3. MATERIAL E MÉTODOS</i>	<i>34</i>
<i>4. RESULTADOS</i>	<i>36</i>
<i>5. DISCUSSÃO</i>	<i>41</i>
<i>6. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS</i>	<i>46</i>
<i>7. BIBLIOGRAFIA</i>	<i>48</i>
<i>8. ANEXO</i>	<i>58</i>

1. INTRODUÇÃO

O cancro engloba um grupo de doenças em que as células anormais perdem o controlo, passando a proliferar desordenada e indefinidamente. É deste modo que as células cancerosas são capazes de invadir os tecidos vizinhos normais, enquanto a disseminação aos tecidos à distância, com conseqüente formação de metástases, é conseguida através da entrada na corrente sanguínea e linfática. O cancro desenvolve-se ao longo do tempo, como resultado de uma mistura de factores relacionados com o tipo de vida, a hereditariedade e o ambiente. Existem vários factores de risco já estabelecidos e embora em algumas pessoas a sua presença não conduza necessariamente ao aparecimento da doença noutras o cancro aparece sem que eles estejam presentes. São exemplo destes factores o tabaco, o tipo de dieta, a radiação ultravioleta (UV), o álcool, a radiação ionizante, químicos e outras substâncias, terapia hormonal de substituição por estrogénios, dietilstilbestrol e factores hereditários.

Esta é uma doença com grande impacto na sociedade, não só devido à sua elevada incidência e mortalidade, como também pelos enormes recursos que requer tanto em termos de prevenção como de tratamento e reabilitação.

A incidência global dos vários tumores não tem parado de aumentar mas para algumas neoplasias a sobrevivência dos doentes também tem aumentado nos últimos anos, sobretudo devido à melhoria das técnicas de rastreio, de diagnóstico, das três modalidades de tratamento que integram a abordagem terapêutica actual - cirurgia, radioterapia e quimioterapia - e ainda da qualidade dos serviços de saúde prestados.

Em Portugal a mortalidade por cancro não tem cessado de aumentar e, se em 1960 era de 9%, em 1998 esta doença ocupava o segundo lugar com 20% de todas as mortes registadas, logo após as doenças vasculares cerebrais com 21% das mortes (Fig. 1) [Pinheiro e col., 2002].

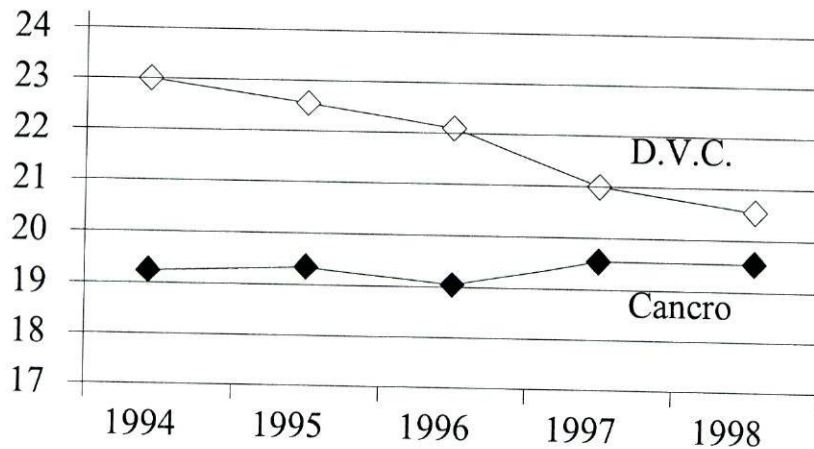


Fig.1 – Mortalidade proporcional das duas principais causas de morte em Portugal: doença vascular cerebral (D.V.C.) e cancro, entre 1994 e 1998 [adaptado de Pinheiro e col., 2002].

1.1. CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO

O carcinoma do colo do útero constitui, logo depois do cancro da mama e do cancro colorectal, a malignidade das mulheres mais comum em todo o mundo, com 371000 novos casos a serem diagnosticados por ano [Franco e col., 2001]. É actualmente uma doença altamente curável através de uma estratégia multidisciplinar de tratamento que inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia, de acordo com o estadio. Mesmo em lesões invasivas, se tratadas em fases iniciais com radioterapia ou cirurgia, são obtidas taxas de cura de 80% ou 90% respectivamente. A radioterapia, que é o tratamento de eleição para doentes com doença avançada locoregionalmente, é curativa em 70% dos casos de estadio II e em 30-50% dos casos de estadio III da classificação da *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO) [Petereit e col., 2000]. A quimioterapia tem sido usada sobretudo como tratamento adjuvante mas em 1999 o *National Cancer Institute* (NCI) recomendou a introdução da cisplatina em doentes a serem tratadas com radioterapia. Este facto ficou a dever-se à verificação da diminuição, em 30-50%, do risco de morte por carcinoma do colo do útero em doentes que integraram cinco ensaios prospectivos de fase III tratados com radioterapia e cisplatina, em comparação com aqueles apenas tratados com radioterapia [Martinez e col., 2000]. Mesmo assim esta doença constitui uma das primeiras causas de morte nas

mulheres, ainda que a incidência e morte por carcinoma invasivo do colo do útero tenham vindo a diminuir desde a década de 60. Isto deveu-se aos esforços na área da detecção precoce e prevenção, sobretudo pela implementação de programas de rastreio que incluem o teste de Papanicolaou. O carcinoma invasivo do colo do útero continua a ser um problema de saúde pública em todo o mundo, nomeadamente nos países onde os programas de rastreio não penetraram eficazmente [Petereit e col., 2000].

Em Portugal, o carcinoma do colo do útero tinha, em 1996-1998, uma taxa de incidência estimada padronizada de 17/100000, sendo a mais alta de toda a União Europeia (Fig. 2).

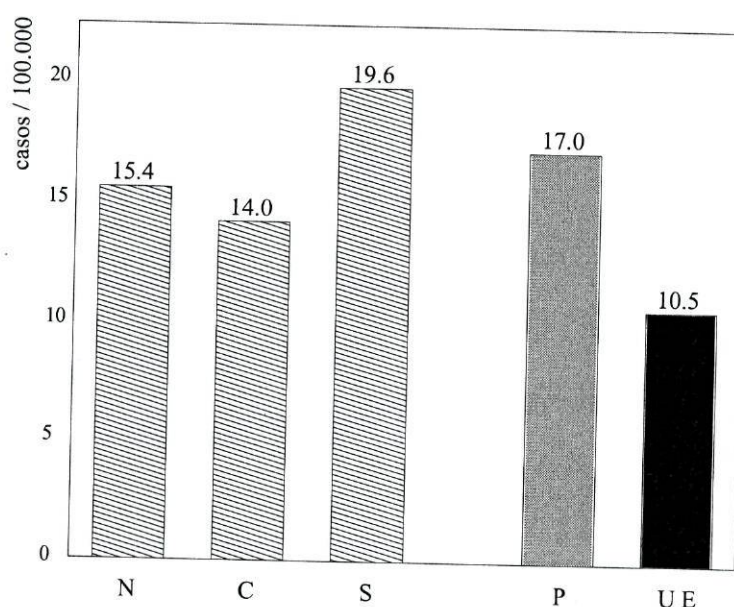


Fig. 2 – Taxas de incidência do carcinoma do colo do útero, ajustadas para a idade, em Portugal (P) - Norte (N), Centro (C) e Sul (S) - e na União Europeia (UE) [adaptado de Pinheiro e col., 2002].

Tal como a taxa de incidência, também a taxa de mortalidade por carcinoma do colo do útero em Portugal era a maior de toda a União Europeia. Embora fosse então responsável pelo sétimo lugar em número absoluto de mortes, constituindo 4.2% das mortes por tumores malignos nas mulheres portuguesas, após padronização da taxa de mortalidade o carcinoma do colo do útero ocupava de facto o quinto lugar, uma vez que afecta sobretudo mulheres mais jovens [Pinheiro e col., 2002]. Só na década de 70 é que a taxa de mortalidade começou a diminuir em Portugal, devido à fraca penetração e desorganização dos programas de rastreio. Este não parece no entanto ter sido o factor

primordial porque, embora o declínio tenha sido de 2.7% nas mulheres entre os 55 e os 74 anos, não se verificou diminuição da mortalidade no grupo etário mais jovem (35-54 anos) [Pinheiro e col., 2002]. O teste de Papanicolaou é capaz de detectar fases pré invasivas do carcinoma do colo do útero - displasia e carcinoma *in situ* -, pelo que o seu efeito inicial consiste na diminuição das taxas de incidência. Como também consegue detectar carcinomas invasivos, se estes forem em grande número, o seu uso conduzirá à diminuição da taxa de incidência de casos invasivos e da taxa de mortalidade. Apesar disso, o declínio das duas taxas já vinha ocorrendo, pelo menos desde a década de 30, ou seja, muito antes da introdução do teste de Papanicolaou.

A maioria dos carcinomas do colo do útero é precedida por uma série de alterações epiteliais actualmente classificáveis pelo sistema de Bethesda, que foi originalmente proposto em 1988. Essas lesões vão desde a simples detecção da infecção por HPV por PCR, sem quaisquer alterações citológicas, até coilocitose ou displasia ligeira (*cervical intraepithelial neoplasia* de tipo I – CIN I) – LGSIL (*low grade squamous intraepithelial lesion*); passando por displasia moderada (CIN II) ou severa (CIN III) e carcinoma *in situ* – HGSIL (*high-grade squamous intraepithelial lesions*); até atipia severa – ASCUS (*atypical squamous cells of undetermined significance*). O comportamento biológico das displasias varia na progressão até cancro invasivo, sugerindo a existência de agentes etiológicos específicos ou alterações genéticas [Janicek e col., 2001; Clarke e col., 2002].

1.2. HPV E O CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO

O carcinoma do colo do útero desenvolve-se através de um processo de vários passos envolvendo genes supressores tumorais e proto-oncogenes mas a infecção das células epiteliais com vírus do papiloma humano (HPV), transmitido por via sexual, é essencial na carcinogénese do colo uterino. Desde meados da década de 70 que zur Hausen sugeriu a associação entre a ocorrência de cancro do colo do útero e a infecção por HPV [Howley e col., 2001]. Hoje é geralmente aceite que todos os casos têm este agente na base da sua etiologia. De facto numa análise meticolosa de um grande número de espécimes tumorais verificou-se a presença de ADN de HPV em 99.7% dos casos [Walboomers e col., 1999; Franco e col., 2001; Clarke e col., 2002].

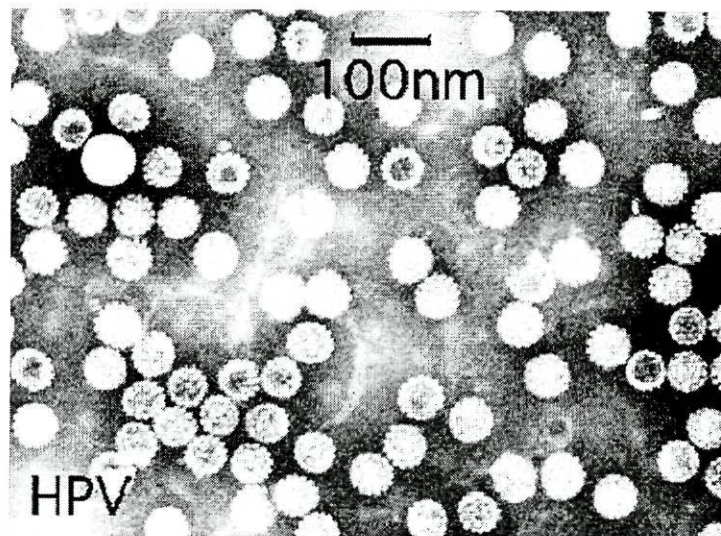


Fig. 3 – Vírus do papiloma humano (HPV) [Janicek e col., 2001].

Os vírus do papiloma humano pertencem ao grupo papovírus, possuem um genoma de ADN em dupla hélice com cerca de 8000 pb e apresentam genótipos consideravelmente variáveis. Existem 85 tipos completamente identificados e sequenciados e mais de 120 tipos a serem actualmente caracterizados [zur Hausen, 2000] e definidos com base na homologia do seu ADN [Franco e col., 2001]. De entre os primeiros, aproximadamente 40 infectam o tracto anogenital. Destes apenas um número limitado ocorre nas biópsias do tracto anogenital, demonstrando capacidade de transformação e imortalização celular. São classificados segundo o seu presumível potencial oncogénico em: alto risco - HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 64, 68 e 69, sendo os mais representativos o 16 e o 18, e baixo risco - HPV 6, 11, 42, 43 e 44, sendo os mais representativos o 6 e o 11 [Franco e col., 2001; zur Hausen, 2000; Scott e col., 2001]. Os HPV de baixo risco são assim considerados porque raramente se encontram nas lesões malignas [zur Hausen, 2000].

Todos os tipos de HPV de alto risco são epiteliotrópicos, estando confinados à camada basal do epitélio pavimentoso do colo uterino [zur Hausen, 2000; Chu e col., 1999]. Aí afectam o programa de diferenciação e induzem proliferação progressiva e displasia das células epiteliais que infectam [Chu e col., 1999]. Na maioria dos casos a infecção não tem manifestações clínicas e é debelada pelo sistema imunológico em 6-12 meses, embora possa ter uma duração mais prolongada até vários anos [Scott e col., 2001; Tommasino e col., 2003]. Por exemplo em adolescentes sexualmente activas

verificou-se que a infecção por HPV regride, em 70-90% dos casos, em 12-30 meses [Scott e col., 2001].

A lesão pré maligna, SIL (*squamous intraepithelial lesion*), pode ser classificada, de acordo com a atipia citológica, em baixo e alto grau. A primeira, atribuída a ambos os HPV de baixo e de alto risco, é de progressão lenta, com 30% dos casos contendo mais de um tipo de HPV e menos de 10% dos casos contendo apenas HPV de baixo risco. A maioria das lesões de baixo grau regridem e menos de 15-25% progredem até alto grau [Chu e col., 1999; Clarke e col., 2002]. As lesões de alto grau, são normalmente monoclonais, contendo HPV de alto risco em 90% dos casos, e apresentam expressão elevada das proteínas virais E6 e E7 [Clarke e col., 2002]. Uma vez atingido alto grau, a maioria das doentes desenvolverão eventualmente carcinoma invasivo, ainda que tal possa ocorrer num espaço de tempo superior a uma década [Chu e col., 1999].

Os genomas de HPV codificam pelo menos seis genes iniciais (*early genes - E*), aqueles que estão envolvidos na indução da proliferação celular, diminuindo o controlo sobre o ciclo celular, e dois tardios (*late genes - L*) com funções no empacotamento e na libertação das partículas virais [zur Hausen, 2000; Street e col., 1995]. Os tipos de alto risco codificam pelo menos três proteínas capazes de estimular a proliferação e a transformação celulares – E5, E6 e E7 [zur Hausen, 2000]. A proteína E5 está muitas vezes ausente em células de carcinoma do colo do útero pelo que não parece ter papel importante na manutenção do fenótipo maligno. A sua função parece sim estar relacionada com a fase de expansão inicial [zur Hausen, 2000]. A proteína E6 dos HPV de alto risco não é capaz de induzir a transformação maligna mas tem um efeito mutagénico e antiapoptótico, importante na progressão tumoral, ligando-se a várias proteínas celulares para subsequente degradação. Uma destas proteínas é a p53, cuja função de transactivação e de supressão tumoral, por regulação negativa do ciclo celular, é assim abolida [zur Hausen, 1999; Petereit e col., 2000]. A proteína E6 é capaz de conduzir à imortalização por várias vias, nomeadamente por activação da telomerase e em cooperação com a proteína E7 [zur Hausen, 2000; Petereit e col., 2000]. A proteína E7 dos HPV de alto risco é também capaz de se ligar a várias proteínas com função importante no ciclo celular e na sua regulação, bem como de promover a integração de ADN estranho na célula infectada, assim aumentando a instabilidade genética [zur Hausen, 2000; Petereit e col., 2000].

A cooperação entre as proteínas do HPV e as proteínas dos oncogenes celulares, assim activadas, aumenta consideravelmente a possibilidade de transformação das lesões pré-malignas até carcinoma invasivo. Assim, a persistência da infecção constitui um factor de risco neste processo [Clarke e col., 2002; Tommasino e col., 2003]. No entanto, a infecção por si só não é suficiente para induzir a conversão maligna [zur Hausen, 1999; de Villiers, 2003] uma vez que, apesar da elevada taxa de incidência de infecção por HPV nas mulheres em geral, apenas 2-3% das mulheres desenvolvem displasia [Clarke e col., 2002]. Por outro lado, apenas uma minoria das lesões infectadas progridem até cancro invasivo, após um longo período de tempo, o que sugere que ocorrem necessariamente eventos adicionais para que se dê a transformação maligna.

1.3. CO-FACTORES NO CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO

Vários co-factores podem intervir no desenvolvimento e progressão do cancro do colo do útero modulando o efeito oncogénico da infecção por HPV [Bayo e col., 2002; Thomas e col., 2001] sendo objecto de grande controvérsia. Dados obtidos de vários estudos epidemiológicos permitiram concluir que os seguintes factores podem ter um papel relevante nesta doença:

- 1) Factores de risco devidos a comportamento sexual de risco como iniciação sexual em idades precoces e maior número de parceiros, o que constitui um modo mais provável de infecção por HPV;
- 2) Factores hormonais associados a paridade elevada e uso de contraceptivos orais. Foi já demonstrado que a elevada paridade aumenta o risco de carcinoma espinocelular do colo do útero entre as mulheres positivas para HPV, pelo que a redução do número de casos recentemente registada na maioria dos países industrializados poderia ser explicada pelo declínio geral da paridade [Muñoz e col., 2002]. A partir de dados obtidos *in vitro* verificou-se a activação de oncogenes virais na presença de hormonas esteróides, enquanto *in vivo* se demonstrou a presença de receptores de estrogénios e de progesterona tanto no colo do útero como em lesões infectadas por HPV, o que sugere que o epitélio cervical pode responder a hormonas exógenas. Estas poderiam contribuir para o desenvolvimento do carcinoma do colo do útero, nomeadamente de

adenocarcinoma [Lacey e col., 2000]. De facto, vários estudos epidemiológicos conduziram à suspeição de que as hormonas femininas exógenas provenientes do uso prolongado de anticoncepcionais orais, particularmente devido a iniciação sexual precoce, podem actuar como co-factores, aumentando o risco de desenvolvimento de carcinoma do colo do útero, em mulheres infectadas por HPV [Moreno e col., 2002]. Mulheres que usavam anticoncepcionais orais há 5-9 anos tinham um risco acrescido de desenvolver carcinoma do colo do útero 2.8 vezes maior que aquelas que nunca os tinham usado. O uso por 10 ou mais anos conduzia a um risco estimado quatro vezes maior [Moreno e col., 2002; Skegg, 2002]. Estes dados são consistentes com o aumento registado na incidência do adenocarcinoma, sobretudo em mulheres jovens [Lacey e col., 2000];

3) Factores resultantes do tabagismo, em associação com a adopção de comportamento sexual de risco relativamente à probabilidade de infecção por HPV [Schiffman e col., 1995]. Por outro lado, foi já verificada a associação entre o fumo do tabaco e o risco de cancro do colo do útero, tendo sido identificados carcinogénios químicos constituintes do fumo do cigarro, como a nicotina e o seu principal metabolito, a cotinina, no muco do colo uterino de mulheres com hábitos tabágicos [Prokopczyk e col., 1997]. Pensa-se que estes possam ter um efeito mitogénico por activação de nitrosaminas carcinogénicas, causando dano no ADN, para além de diminuírem a capacidade de resposta imune local eficaz face à infecção vírica [Hildesheim e col., 2001; Kjellberg e col., 2000]. O factor de risco aumenta com o consumo, tendo em conta a duração dos hábitos tabágicos, a intensidade e o número de maços de tabaco por ano [Ylitalo e col., 1999; Kjellberg e col., 2000];

4) Factores devidos à infecção por outros agentes sexualmente transmitidos. O vírus herpes simplex-2 e *Chlamydia trachomatis* poderiam actuar sinergisticamente com os HPV [Schiffman e col., 1995; Ylitalo e col., 1999];

5) Factores relacionados com elementos constituintes da dieta. Por exemplo micronutrientes como o ácido fólico, as vitaminas A, E, C e β -caroteno poderiam ter um papel de prevenção no carcinoma do colo do útero [Schiffman e col., 1995; Kjellberg e col., 2000]. Também a ingestão do indole-3-carbinol, um fitoquímico anticarcinogénico e antiestrogénico, proveniente da quebra dos glucosinolatos que existem em elevada concentração em plantas crucíferas do género *Brassica* (couve, brócolo, couve-de-bruxelas, couve-flor), teria uma forte

acção de indução da 2-hidroxilação, diminuindo a 16 α -hidroxilação [Jin e col., 1999]. O indole-3-carbinol parece exercer um efeito de modulação da actividade relativa das enzimas responsáveis pela 2-hidroxilação e pela 16 α -hidroxilação, determinando a direcção do metabolismo dos estrogénios. [Auborn e col., 1991]. O aumento da conversão do estradiol em 16 α -hidroxiestrone é um factor conhecido de risco para cancro em células sensíveis aos estrogénios. No colo do útero a 16 α -hidroxiestrone e os HPV de alto risco parecem ter uma acção sinérgica, com a primeira a intensificar a actividade génica dos segundos, promovendo a carcinogénese [Auborn e col., 1991; de Villiers, 2003];

6) Factores resultantes de estados imunologicamente deprimidos como aqueles que ocorrem em indivíduos infectados com HIV (*human immunodeficiency virus*) ou em doentes sujeitos a transplante renal, o que implica um risco aumentado de infecção por HPV [Schiffman e col., 1995; Clarke e col., 2002]. A reactividade imunológica poderia ser o factor responsável pela eliminação do vírus e da doença, não ocorrendo progressão até carcinoma invasivo [Kadish e col., 2002; Clarke e col., 2002]. Por outro lado, a localização específica do HPV, e portanto a replicação do ADN viral e subsequente formação de partículas, nas células externas diferenciadas do epitélio, pode conduzir por si só a menor exposição destes vírus à interferência imunológica, permitindo a adaptação de novas estirpes a novos epitélios [zur Hausen, 2000].

7) Vários indicadores do estatuto socioeconómico uma vez que o carcinoma do colo do útero e a infecção por HPV, afectam sobretudo mulheres de baixo nível social e educacional e de baixo rendimento. A estes factores estão também associados outros como deficiências nutricionais, elevada paridade e infecções genitais [Schiffman e col., 1995].

A persistência do HPV no epitélio do colo uterino, bem como o desenvolvimento de carcinoma e das subseqüentes metástases, requer claramente outras alterações, envolvendo a indução de instabilidade cromossómica, nomeadamente por mutações e por perda alélica de heterozigotia [zur Hausen, 2000; Clarke e col., 2002], com a consequente inactivação e deleção de múltiplos genes supressores tumorais.

Para alterar o controlo do ciclo celular e induzir a imortalidade, por progressão até à conversão maligna, é necessária uma complexa inter-relação entre os genes da célula e do vírus [de Villiers, 2002]. A integração pode ser importante na progressão e manutenção da neoplasia, constituindo um mecanismo possível para o efeito

oncogénico do HPV. De facto, já foram identificadas as proteínas dos genes iniciais *E6* e *E7* do HPV, que interagem com as proteínas reguladoras da proliferação das células humanas p53 e pRb [Schiffman e col., 1995].

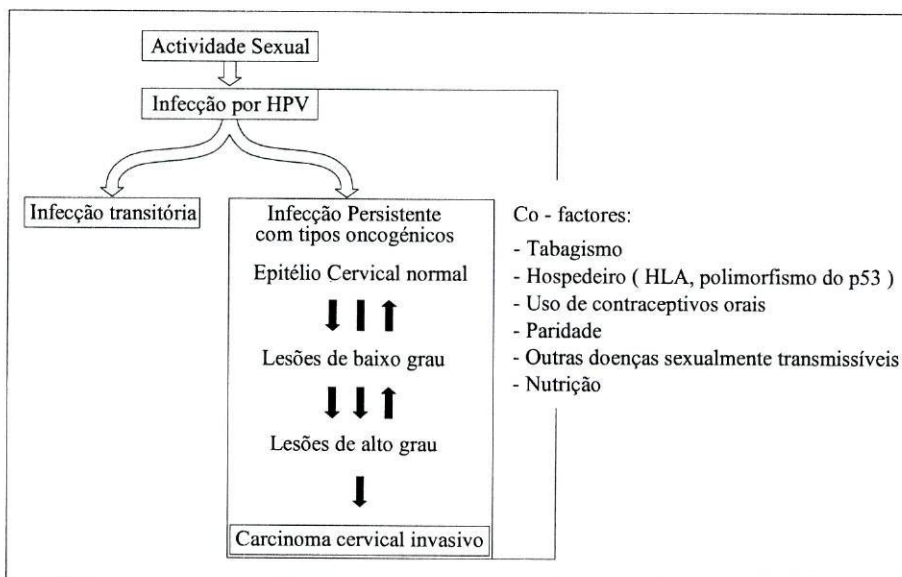


Fig. 4 – Relação entre a infecção por HPV e os co-factores no carcinoma do colo do útero [adaptado de Franco e col., 2001].

1.4. O CICLO CELULAR, O *p53* E O *p73*

O ciclo celular consiste numa sucessão de acontecimentos que conduzem à duplicação do material genético e de outros componentes celulares e eventualmente à divisão da célula. As fases do ciclo celular são: a fase G1 (*gap*) em que ocorre a síntese das enzimas envolvidas na replicação do ADN; a fase S de síntese do ADN; a fase G2 de condensação cromossómica, eliminação da membrana nuclear e entrada em fase de mitose (M). Qualquer célula em proliferação tem ainda a possibilidade de entrar em fase G0 que é uma fase quiescente reversível ou não, segundo as condições do meio.

Durante os processos de regulação a célula activa e desactiva as proteínas, respectivamente por adição pelas cinases ou remoção pelas fosfatases de grupos fosfato (-PO₄). Para maior rapidez e eficácia as cinases e as fosfatases podem unir-se fisicamente à proteína que modificam, com formação de complexos multiproteína.

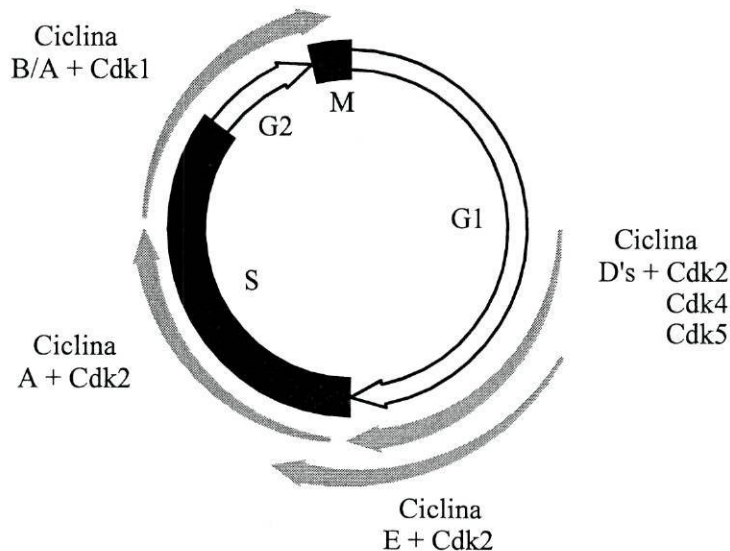


Fig. 5 – Interações entre várias ciclinas e cdk's em diferentes etapas do ciclo celular de células de mamífero [adaptado de Sherr e col., 1993].

À medida que a célula vai necessitando de produzir novas proteínas também as vai degradando activamente. Isto acontece pela via da ubiquitina que é um processo irreversível de vários passos, em que as proteínas são covalentemente modificadas pela adição da ubiquitina, marcando-as para serem degradadas no proteossoma [Irwin e col., 2001; Coleman e col., 2000].

O ciclo é conduzido pela activação sequencial de uma série de cinases (as *cyclin-dependent kinases* - cdk), que são reguladas por outras proteínas, as ciclinas, que a elas se ligam e que possuem diferente actividade de acordo com as diferentes fases [Piwnica-Worms, 1999; Coleman e col., 2000]. As ciclinas variam a sua concentração durante o ciclo celular, ao contrário das ciclinas dependentes das cinases que mantêm a sua concentração. Quando uma dada ciclina atinge uma concentração suficiente, une-se à cinase dependente da ciclina adequada, dando-se a activação e a cinase é capaz de fosforilar determinadas proteínas celulares. A progressão do ciclo celular ocorre porque, posteriormente, esta ciclina é degradada via ubiquitina-proteossoma, pelo que a cdk perde a actividade, activando-se em seguida outra ou outras cdk's, razão pela qual aumenta a concentração de outras ciclinas.

Para a progressão através do ciclo celular é necessário um sistema de verificação do ADN que assegure a duplicação total do genoma dum modo ordenado e com elevada fidelidade [Coleman e col., 2000]. As alterações no controlo do ciclo celular normal

conduzem a instabilidade genética, que parece ser um factor importante na carcinogénese. É por isso que a existência de pontos de verificação da integridade e do estado da replicação do material genético, que possibilitem a paragem da progressão do ciclo celular em caso de dano ou mutação do ADN, para que este seja avaliado e reparado, assegura a complexidade e irreversibilidade do ciclo celular, bem como dos processos de activação, expressão e degradação das proteínas envolvidas. Por outro lado a morte celular fisiológica nos tecidos que se autoregulam, como a pele, o intestino e a medula óssea, é necessária para dar lugar às células que são constantemente formadas: é a morte celular programada também denominada de apoptose. Neste processo, em que estão envolvidos vários genes reguladores e uma família de proteases, as caspases, as células são fragmentadas em corpúsculos envolvidos por membrana, com consequente fagocitose pelas células vizinhas, sem resposta inflamatória ou cicatrização tecidual [Reed, 1999]. A falha na indução da apoptose contribui para a carcinogénese por permitir a ocorrência de instabilidade genética e a desregulação da actividade dos genes envolvidos no controlo do ciclo celular e dos respectivos pontos de verificação.

O *p53* é um gene supressor tumoral humano de 20 kb e 11 exões, localizado na região cromossómica 17p13, que codifica a fosfoproteína nuclear p53, normalmente expressa em baixa quantidade e com um tempo de vida curto. Estruturalmente a p53 possui três domínios: um terminal NH₂- de transactivação, um central de ligação ao ADN e um terminal COOH- de oligomerização [Irwin e col., 2001].

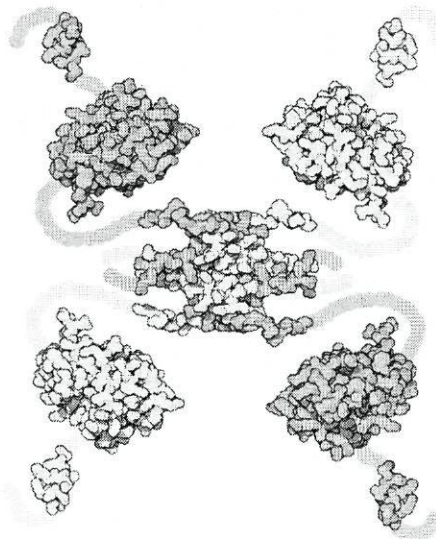


Fig. 6 – Estrutura tetramérica da p53 [www.rcsb.org/pdb/molecules/p53-unbound.gif].

A sua função essencial, que é bem conhecida, consiste em bloquear as células na fase G1, o primeiro ponto de verificação na passagem da fase G1 para S, assim evitando a replicação inapropriada do ADN e a propagação de erros genéticos. Isto acontece após dano ao ADN, que pode ser induzido por radiação ionizante ou UV, carcinogénios químicos, hipóxia, depleção de nucleótidos ou desequilíbrio oncogénico [Bouvard e col., 2000; Piwnica-Worms, 1999]. A p53, cujos níveis são então aumentados, é capaz de se ligar ao ADN e activar vários genes entre os quais o *p21/waf1/cip-1* (*CDKN1A*). Este gene, quando sobreexpresso, é um inibidor das cdk e do crescimento celular [Wang e col., 1999], não se dando a fosforilação da pRb nem a activação dos factores de transcrição E2F necessários à acumulação dessa enzimas, necessárias para a entrada em fase S [Qin e col., 2003]. A p53 é degradada pela via da ubiquitina com interferência da M2M ligase. Por sua vez, o gene *HDM2* (homólogo humano do *MDM2*) constitui um alvo do *p53* com consequente estabelecimento de um mecanismo de *feedback*. A estabilização e acumulação da p53 podem ser induzidas por muitas proteínas como as c-myc, E1A, Ras e E2F. A indução da p53 pelo E2F1 é indirecta, uma vez que este activa primariamente a proteína 14ARF (*CDKN2A*). Esta, por sua vez neutraliza a MDM2, assim estabilizando a p53, o que resulta na paragem do ciclo celular ou na entrada em apoptose [Irwin e col., 2000, Soengas e col., 2000].

A indução da entrada das células danificadas em apoptose, com consequente remoção destas da porção replicativa da população é outra das funções do gene *p53*. A p53 interactua com vários genes proapoptóticos classificados em três grupos de acordo com a sua localização subcelular: o primeiro grupo codifica proteínas que se localizam na membrana celular (por exemplo CD95, KILLER/DR5 e PERP); o segundo grupo codifica proteínas que se situam no citoplasma (por exemplo PIDD e PIG's); finalmente o terceiro grupo codifica proteínas que se localizam na mitocôndria (por exemplo Bax, Noxa, Puma, Bid e p53Aip1) [Fei e col., 2002]. O gene *p53* é também responsável pela regulação dos genes antiapoptóticos da família BCL2, reprimindo a sua transcrição [Coleman e col., 2000].

A função do gene *p53* na fase G2, o outro ponto de verificação do ciclo celular antes da segregação na mitose, não é muito bem conhecida. Pensa-se que a p53 activa a transcrição das sete proteínas da família 14-3-3, que estão envolvidas na proliferação celular, no controlo dos pontos de verificação e na apoptose. Foi já demonstrado em células epiteliais que, quando existe dano ao ADN provocado por radiação γ , a expressão da proteína 14-3-3 σ é induzida via *p53*, bloqueando o ciclo celular em G2M

[Piwnica-Worms, 1999]. Por outro lado, verificou-se que, após dano induzido por radiação UV, mas não por radiação ionizante, o gene *GADD45* é essencial para a transição de G2 para M de um modo dependente de *p53*. De facto continua a existir bloqueio em G2M em células deficientes em *GADD45*. Parece por isso existir uma multiplicidade de vias de controlo de G2M de acordo com o tipo de dano [Wang e col., 1999].

O gene *p53* está alterado em cerca de 50% de todos os tumores humanos. As alterações que pode sofrer incluem várias mutações genéticas ou inactivação da proteína. A deleção ou a inactivação do *p53* resultam na perda da integridade dos pontos de verificação (*checkpoints*) das células, que então prosseguem sem verificação através do ciclo celular, tornando-se mais resistentes à quimioterapia e à radioterapia, em vez de serem bloqueadas para reparação do dano do ADN ou para entrada em apoptose [Street e col., 1995]. Os vírus são capazes de inactivar o *p53* e outro gene supressor tumoral, o *pRb*, de um modo similar, o que constitui uma via fundamental na indução da transformação oncogénica. A proteína E6 dos HPV de alto risco é capaz de se ligar à *p53*, por intermédio da ligase da ubiquitina E6-AP, inactivando-a por degradação independente da MDM2, assim ultrapassando a acção protectora do *p53* e o ponto de verificação de G1S [zur Hausen, 2000; Hengstermann e col., 2000]. Deste modo as células com danos no ADN prosseguem em ciclo, o que consiste na principal causa de instabilidade cromossómica com consequências em termos do estado mutacional das células infectadas. A proteína E7 liga-se à *pRb*, que ao ficar inactivada já não se liga à E2F, permitindo que esta se ligue ao ADN com consequente progressão do ciclo celular de G1 para S.

Até há bem pouco tempo julgou-se que o gene *p53* era único na sua função de guardião da célula. Em 1997 foram descobertos dois genes da mesma família, o *p73* e o *p63*, similares quanto à estrutura e a algumas funções, como formar homo-oligómeros, ligar-se ao ADN, activar a transcrição de genes alvo do *p53* e induzir a apoptose. Também são semelhantes quanto à organização exão/intrão e ao facto de o primeiro intrão ser grande e o primeiro exão não ser codificante. Contrariamente ao *p53* estes dois genes dão origem a múltiplas isoformas e só raramente aparecem mutados [Irwin e col., 2001].

No que concerne à semelhança estrutural do *p73* com o *p53* existe 29% de identidade quanto ao domínio de transactivação (*transactivation domain* - TAD; aminoácidos 1-45), 63% quanto ao centro de ligação ao ADN (*DNA binding domain* -

DBD), com conservação total dos seis pontos frequentes de mutação (*hot spots*; aminoácidos 113-190) e 38% quanto ao terminal de oligomerização (*oligomerization domain* - OD; aminoácidos 319-363) [Clurman e col., 1997]. O gene *p73* tem cerca de 65kb, 14 exões e pelo menos seis isoformas (α , β , γ , δ , ϵ , ζ) dependendo do terminal COOH-. Possui ainda outras duas formas ($\Delta Np73\alpha$, $\Delta Np73\beta$) que não têm o terminal de transativação NH2- e que resultam de um promotor alternativo localizado no intrão 3. Estas duas isoformas estão presentes sobretudo nos neurónios em desenvolvimento [Irwin e col., 2001].

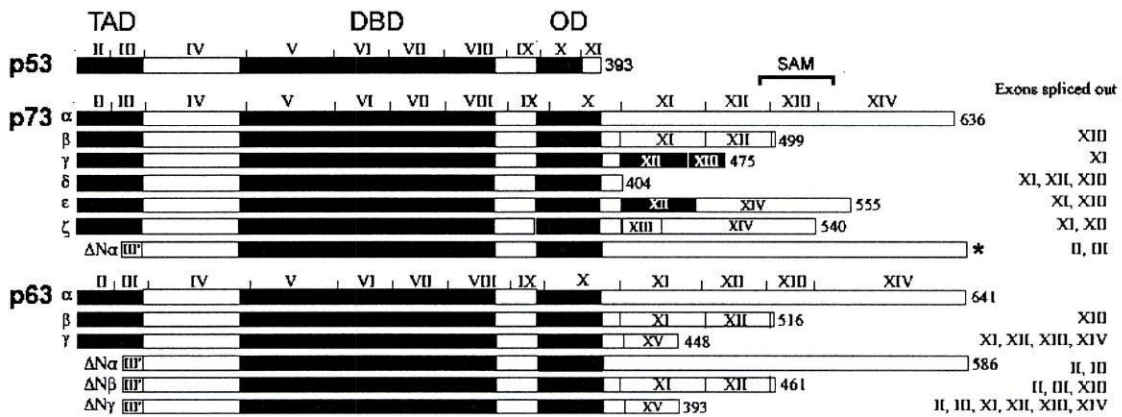


Fig. 7 – Representação esquemática da estrutura dos exões das proteína p53 e das isoformas da p73 e p63 mostrando as diferentes porções em que se dividem (TAD; DBD; OD –; SAM – *sterile alpha motif*) [Levrero e col., 2000].

O gene *p73* está localizado em 1p36.3 [Cai e col., 2000; Han e col., 1999], região que sofre deleções por perda de heterozigotia num grande número de tumores, incluindo os da pele, cólon, mama e fígado e neuroblastoma [White e col., 1999].

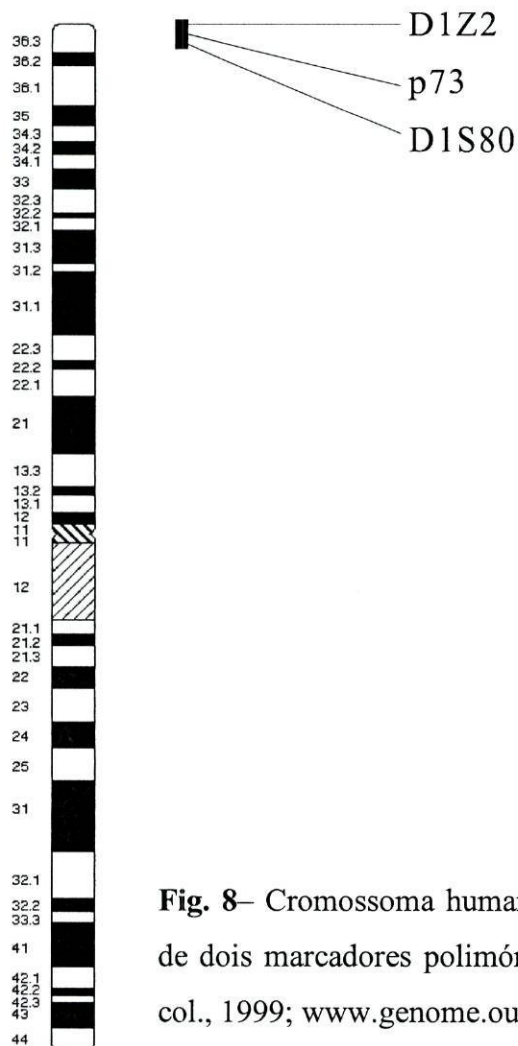


Fig. 8– Cromossoma humano 1 e localização do gene *p73* e de dois marcadores polimórficos na região 1p36 [Ichimiya e col., 1999; www.genome.ou.edu/maps/ch1.gif].

A acumulação da *p73* em resposta a dano ao ADN conduz à inibição da proliferação celular, dum modo semelhante ao da *p53*, por paragem do ciclo celular e/ou indução da apoptose. O *E2F1*, o mais potente indutor da apoptose de entre a família E2F, activa a transcrição do *p73* com subsequente aumento dos níveis da *p73*. Também a transactivação da *p73* pela E7 dos HPV oncogénicos em células e biópsias do colo do útero é conseguida por esta via dependente de *E2F* [Brooks e col., 2002]. Este é um mecanismo alternativo através do qual o *E2F1* pode induzir apoptose na ausência da *p53* [Irwin e col., 2000].

O *p73* é capaz de inibir a proliferação celular e induzir a apoptose de uma maneira semelhante à do *p53*, activando a transcrição de genes alvo do *p53* como o *Bax-1*, menos eficazmente, e o *p21* que é responsável pelo bloqueio em G1 dependente do *p53* [Jost e col., 1999; Clurman e col., 1997], de um modo que é várias vezes menos

eficaz que a indução dependente da p53 [Zhu e col., 1998]. A activação do *p21* pela p73 é inibida pela inactivação desta pela E6 dos HPV, tanto de alto como de baixo risco, através de interacções proteína-proteína e não pela via da ubiquitina como sucede com a p53 [Park e col., 2001].

Em contrapartida a p73 é capaz de induzir, várias vezes mais eficazmente (3-6 vezes) do que a p53, a proteína 14-3-3 σ , que participa na paragem do ciclo celular em G2 [Zhu e col., 1998], bloqueio cuja regulação é menos conhecida.

A estabilização da p73 pela c-Abl tirosina cinase, que é a proteína do gene humano homólogo do *v-Abl* (oncogene do vírus da leucemia de Abelson em ratinhos), conduz ao prolongamento do seu tempo de vida [Gong e col., 1999]. Foi já demonstrada a ligação *in vitro* da c-Abl, através do seu domínio SH3 terminal, ao domínio terminal de oligomerização da p73 após irradiação (20 Gy), seguida da fosforilação do resíduo de tirosina da posição 99 [Yuan e col., 1999]. A interacção do *MDM2* e do *p73* não é bem conhecida mas sabe-se que a *MDM2* se liga à p73 através do seu terminal N- ainda que não afectando a sua estabilidade ou o seu tempo de vida. Por outro lado, é necessário que a ligação entre a *MDM2* e a p73 seja quebrada, talvez pela c-Abl, para que se dê o estímulo das funções de transcrição e apoptose da p73 [Levrero e col., 2000] nomeadamente após dano ao ADN por cisplatina e radiação γ .

A c-Abl é directamente fosforilada pela ATM após dano ao ADN por radiação γ e cisplatina mas não por radiação UV, em que não há interferência do *p73*. [Coleman e col., 2000]. De facto, embora a radiação UV e a radiação ionizante sejam ambas agentes físicos capazes de danificar o ADN, o tipo de lesões induzidas é diferente. Enquanto a radiação UV induz predominantemente dímeros de pirimidina e fotoprodutos a radiação ionizante induz rupturas cromossómicas simples e duplas e ainda várias alterações nas bases do ADN.

1.5. RESPOSTA À RADIAÇÃO IONIZANTE, O *p53* E O *p73*

A ataxia telangiectasia (At) é uma doença autossómica recessiva causada pelo gene *ATM*, um gene muito relevante em radiobiologia, dado que o seu estudo tem contribuído para o entendimento da resposta biológica à radiação. Este interesse foi despoletado quando se verificou que os doentes homozigóticos para o gene *ATM*

apresentavam sérios problemas clínicos demonstrando hipersensibilidade à radiação, com formação de grande número de aberrações cromossômicas e maior intensidade de morte celular. São também mais susceptíveis ao desenvolvimento de neoplasias, o que parece dever-se a deficiências na reparação do ADN [Hall, 2000].

A inactivação do gene *ATM* resulta em alterações ao nível dos telómeros o que pode ser responsável pela transformação e malignidade celulares subsequentes [Hall, 2000]. A proteína ATM está relacionada com uma grande família de proteínas homólogas, as DNA-PK, que estão envolvidas na reparação das duplas quebras cromossômicas. As células At não parecem ter grandes deficiências de reparação mas sim dificuldades na detecção da presença de dano no ADN, nomeadamente das duplas quebras cromossômicas induzidas pela radiação ionizante [Coleman e col., 2000].

A radiação ionizante induz quebras cromossômicas simples que normalmente têm poucas consequências em termos de mortalidade celular, uma vez que são rapidamente reparadas tomando como molde a cadeia complementar. Só se a reparação for mal conduzida é que pode ocorrer uma mutação. Se a quebra acontecer em duas cadeias opostas ou apenas separadas por alguns pares de bases, estabelece-se uma dupla quebra cromossômica. Esta é a lesão mais importante causada ao ADN, durante o trajecto das partículas carregadas ou das espécies químicas resultantes destas, ambas postas em movimento pelos fotões da radiação ionizante. Estas quebras são reparadas e restabelecida a integridade mas se este processo for mal conduzido poderão advir diversos tipos de aberrações cromossômicas.

A radiosensibilidade varia de acordo com a fase do ciclo em que as células são irradiadas, embora o motivo para este facto continue a ser desconhecido e alvo de estudo. O ponto de maior sensibilidade ocorre na mitose ou perto da mitose e em G2, enquanto o de menor sensibilidade se situa na parte final da fase S. A ordem de grandeza da diferença entre o ponto de menor sensibilidade e o de maior sensibilidade é de 3 [Hall, 2000]. Pensa-se que nas fases mais sensíveis a causa esteja relacionada com a existência de uma quantidade dupla de ADN devido à replicação. Por outro lado, na fase mais resistente a explicação para a menor radiosensibilidade estaria associada à condensação dos cromossomas em entidades discretas, bem como aos níveis de compostos sulfídricos que ocorrem naturalmente na célula e que são fortes protectores contra a radiação e contra os efeitos citotóxicos de vários agentes quimioterapêuticos como a cisplatina. A radiação destrói as células nas fases mais sensíveis do ciclo, ficando as células resistentes em condições de progredirem para as fases mais sensíveis

do ciclo. É este processo que é utilizado em radioterapia clínica e que se repete cada vez que uma nova fracção diária é administrada durante o tratamento. A radiação tem assim uma acção de sensibilização devido à sincronização que estabelece, factor que é aproveitado em termos de ganho terapêutico durante o fraccionamento de dose em radioterapia.

Quando uma dose total é dividida em fracções, as lesões subletais radioinduzidas, aquelas que por não serem letais podem ser reparadas, contribuem para o aumento da sobrevivência celular. A reparação das lesões subletais reflecte a reparação das duplas quebras cromossómicas e dá-se tanto mais rapidamente quanto maior for a taxa de proliferação celular do tecido irradiado. Se as duplas quebras cromossómicas não forem totalmente reparadas, podem interaccionar com outras produzidas por uma nova dose/fracção de radiação, tornando a lesão irreparável e consequentemente letal.

Em radioterapia considera-se que a reparação total das lesões subletais nos tecidos normais, responsáveis pelos efeitos tardios da radiação, ocorre num período que varia entre 4 e 6 horas. De facto, as conclusões obtidas em várias experiências de fraccionamento de dose constituem o fundamento para se administrarem fracções com intervalos superiores a 6 horas, pelo que o efeito de cada fracção se mantém independente [Hall, 2000].

Embora o tipo de morte celular radioinduzido dependa do tipo de célula, a principal forma de morte é a mitótica. Esta ocorre devido aos danos nos cromossomas, quando as células tentam dividir-se, o que pode acontecer uma ou duas divisões depois. A radiação ionizante é também capaz de induzir o bloqueio em G1S e a apoptose via activação do *p53*. No entanto, em ratinhos deficientes em *p53* as células continuam a progressão para a fase S mas acumulam-se em G2M sem conseguirem entrar em mitose, presumivelmente por possuírem muitos danos no ADN. É nessa altura que é activado um processo de indução da apoptose independente de *p53* [Merritt e col., 1997]. A *p73* é capaz de induzir a apoptose e o bloqueio em G1 por activação dos genes alvo do *p53*, como o *p21* [Zhu e col., 1998]. Por outro lado, a proteína ATM é directamente activada pela radiação, fosforilando por sua vez a *p53* [Hall, 2000]. As células At não apresentam bloqueio em G1, enquanto a indução da *p53* é menos intensa e atrasada. Nestas células a indução do *p53* é normalmente mantida após irradiação UV. De qualquer forma, em ratinhos deficientes em *p53* verificou-se que a radiorresposta era

equivalente à dos ratinhos normais o que corrobora a hipótese de que a p53 não toma parte na reacção aguda à radiação.

Em radioterapia, modalidade terapêutica fundamental no tratamento do cancro do colo do útero, é bem conhecida a indução do bloqueio das células em G2M pela radiação. O bloqueio em G2M é aquele que é mais radioinduzido como resposta protectora das células, que assim têm tempo para procederem à reparação das duplas quebras cromossómicas. De facto o acúmulo de células em G2M, medido por citometria de fluxo, foi já demonstrado em biópsias de carcinomas do colo do útero após uma semana de tratamento (10 Gy) [Bravo e col., 1995].

O *p53* não parece ser necessário no bloqueio em G2M porque este ocorre quando o *p53* é inactivado pela E6 do HPV 16. Foi demonstrado que a proteína do oncogene *c-Abl* se associa à p53 e à pRb no núcleo após irradiação ionizante. A activação da *c-Abl* por fosforilação directa pela ATM acontece após irradiação ionizante mas não após radiação UV [Gong e col., 1999]. Por outro lado, verificou-se que a co-expressão da p73 e da *c-Abl* é muito intensa 6 horas depois da irradiação, e a um nível muitas vezes superior àquele obtido com a p53, daí resultando a entrada em apoptose [Agami e col., 1999] ou o bloqueio em G2M. Nas células At este bloqueio é menos intenso não se dando a activação da p21, das cdk's, da pRb e da MDM2 [Coleman e col., 2000].

Os compostos da cisplatina produzem ligações cruzadas intra e entre as cadeias de ADN, assim inibindo a síntese de ADN, o que ocorre na fase S. Deste modo, a cisplatina é um fármaco que actua mais eficientemente nos tecidos de proliferação rápida. Para além disso é mais tóxico para as células hipóxicas, mais resistentes à radiação, do que para as células oxigenadas. Esta característica transforma-o num radiosensibilizador das células hipóxicas, portanto de uso potencial em radioterapia. Na resposta à cisplatina está envolvida uma via em que é necessária a ciclina cdc2 cuja fosforilação promove a ligação às proteínas 14-3-3 que sequestram o complexo cdc2-ciclina B no citoplasma e bloqueiam as células com danos no ADN em G2M. A p73 é capaz de activar a proteína 14-3-3 3-6 vezes mais intensamente que a p53 [Zhu e col., 1998]. Por outro lado, verificou-se que a activação da *c-Abl* com consequente acúmulo da p73 após dano ao ADN é um processo independente do *pRb* mas que requer as proteínas MMR (*mismatch repair*). Estas proteínas estão envolvidas na correcção dos erros de replicação e na resposta celular a algumas lesões do ADN. Foi já demonstrada a ligação de algumas destas proteínas à p73 após dano por cisplatina com subsequente

indução da apoptose [Shimodaira e col., 2003] .Devem por isso existir outras vias de apoptose independentes do *p53* [Gong e col., 1999]. A cisplatina é capaz de induzir duas vias de apoptose: uma dependente de *p53* e sem interferência do *c-Abl* e outra dependente do *p73* em que a co-expressão da *c-Abl* contribui para a morte celular [Gong e col., 1999].

No tratamento do carcinoma do colo do útero a radioterapia constitui uma terapêutica de eficácia reconhecida, enquanto a cisplatina tem tido utilização crescente demonstrando ultimamente bons resultados. Parece possível que na resposta ao dano ao ADN causado por estes dois agentes terapêuticos o gene *p73* esteja activamente envolvido, sobretudo na indução da apoptose, via fosforilação da *c-Abl*, e do bloqueio em G2M, por indução da família 14-3-3, de um modo independente de *p53*.

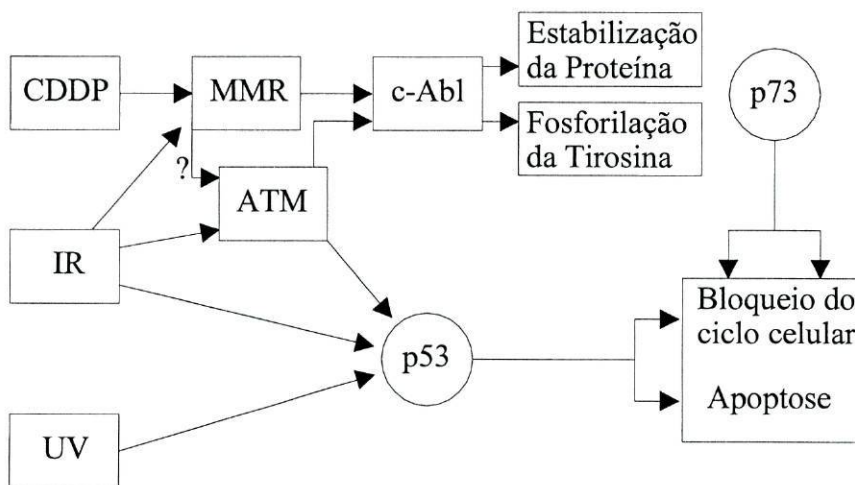


Fig. 9 – Bloqueio do ciclo celular e indução da apoptose pelo *p53* e *p73* por activação pelo dano ao ADN pela UV, radiação ionizante (IR) e cisplatina (CDDP) [Levrero e col., 2000].

1.6 POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Foi em Medicina Legal em 1985 que Jeffreys e col. em Inglaterra, desenvolveram um método de tipagem do ADN (*DNA fingerprinting*) para ser usado em perícias de Biologia Forense, na resolução de casos de investigação biológica de

paternidade e de criminalística biológica. Esta análise directa do material genético para identificação das pessoas envolvidas foi pela primeira vez usada como prova pericial no tribunal, em 1986 em Inglaterra e em 1987 nos E.U.A. Fundamenta-se na individualidade, igualdade em todas as células de cada ser humano e inalterabilidade ao longo da vida do ADN [Pinheiro, 1996]. Graças a esta diversidade parecia estar conseguida a caracterização única de cada indivíduo por identificação genética.

Com a verificação da extraordinária variação ao nível da sequência do ADN, a atenção centrou-se no estudo dos polimorfismos. Os polimorfismos genéticos consistem na ocorrência de diferentes formas de um mesmo gene - os alelos - constituindo variações genéticas relativamente comuns numa população. Actualmente, um dos conceitos de polimorfismo mais usado caracteriza qualquer alteração genética da sequência de ADN num locus genético (mutação ou outra), presente em pelo menos 1% da população [Medeiros, 2002]. Muitos polimorfismos são marcadores genéticos importantes e com aplicação médico-legal. Estes são sobretudo localizados em ADN de regiões hipervariáveis, ou seja, não codificante e repetitivo [Pinheiro, 1996]. Os polimorfismos podem ser analisados com recurso a diversas tecnologias. Utilizando a técnica de *southern blotting* e hibridização com uma sonda de ADN apropriada, após digestão com uma enzima de restrição, Kan e Dozy (1978) descobriram os RFLP's - *restriction fragment length polymorphisms*. A enzima de restrição reconhece e quebra uma dupla sequência pequena e definida, onde quer que ela exista no ADN, produzindo fragmentos de tamanhos diferentes que reflectem variações de sequência e que podem ser separados por electroforese. Na sua grande maioria os RFLP's reflectem duas ou poucas variações entre dois indivíduos, assim constituindo marcadores pouco informativos, o que limita o seu uso [Beaudet e col., 1995].

No genoma humano existem regiões em que o ADN é codificante e não repetitivo (10% do genoma), constituindo a maior parte do ADN que forma os genes estruturais e que codifica proteínas. A maior parte do genoma é constituído por ADN de tipo não codificante e repetitivo, hipervariável e com função biológica não estabelecida. Estas sequências de ADN flanqueiam os genes (justagénicas) e, por vezes, podem mesmo fazer parte das regiões intrónicas desses genes (intragénicas).

Polimorfismos de repetição

VNTR's - variable number of tandem repeats: Constituem uma classe de marcadores que consistem em polimorfismos de ADN hipervariável, repetitivo e não codificante, ou ADN minissatélite. Por *southern blotting* são detectadas unidades de repetição em que uma sequência de bases se repete em cadeia, um determinado número de vezes (*tandem repeats*). O resultado final é um padrão de bandas diferente para cada indivíduo, daí que seja considerado um modo de identificação seguro para propósitos forenses, nomeadamente através do uso de várias sondas para diferentes marcadores. Cada fragmento possui 10 a 70 pb e repete-se 20-60 vezes. Estes marcadores são muito polimórficos e os alelos reflectem um número diferente de unidades de repetição sendo portanto mais informativos que os RFLP's. Nos polimorfismos de repetição o número de repetições de um locus é muito variável e cada variação constitui um alelo. Como resultado a heterozigotia é comum enquanto os loci homozigóticos são pouco frequentes. Estudos posteriores permitiram perceber que cerca de 1 em cada 100 a 1 em cada 200 pares de bases são polimórficos no genoma humano, o que é consistente com a existência de heterozigotia em 1 em cada 250 a 1 em cada 500 pares de bases. Com o reconhecimento da grande variedade de polimorfismos na sequência de ADN, incluindo aquela não codificante e que por isso não é expressa, presume-se que grande parte dos polimorfismos não tenha efeitos no fenótipo [Beaudet e col., 1995].

Esta metodologia tem a desvantagem de requerer grandes quantidades de ADN de boa qualidade, para além de que o padrão de bandas resultante é de tratamento estatístico complicado. Por isso se procuraram polimorfismos mais pequenos que pudessem ser analisados em ADN de menor qualidade. Exemplo deste tipo de polimorfismo é o marcador D1S80, cuja unidade de repetição de 16pb (exceptuando a primeira que só tem 14pb) se repete 14 - 41 vezes em 28 alelos diferentes. Por ser mais pequeno é susceptível de ser detectado por PCR (*polymerase chain reaction*), produzindo-se AFLP's (*amplified fragment length polymorphisms*), razão pela qual tem sido muito usado em Biologia Forense. Nesta técnica de detecção o ADN é amplificado com recurso a pequenas sequências sintetizadas de ADN (*primers*) que flanqueiam a cadeia de unidades de repetição e que hibridam com as extremidades 3' da dupla cadeia. A reacção de amplificação é rápida, de fácil automatização e permite amplificar e analisar pequenas quantidades de ADN de menor qualidade.

STR's - short tandem repeats: Esta classe de marcadores é também constituída por ADN repetitivo e não codificante - ADN microssatélite -, ocorrendo frequentemente e de um modo disperso no genoma humano. A unidade de repetição é mais pequena que nos VNTR's, da ordem das 2 a 7 pb, e aparece repetida de 5 a 30 vezes. Os STR's são detectados por PCR e com recurso a um sistema multiplex podem ser analisados 10 ou 13 loci simultaneamente numa única reacção de amplificação. Embora cada locus seja moderadamente polimórfico, portanto com baixo poder de discriminação, é independentemente herdado pelo que o poder de discriminação final global de todos os loci examinados é maior que um em um bilião [Linacre e col., 2002]. Assim os STR's são ideais para propósitos forenses porque muito informativos. Por outro lado, a técnica de PCR permite poupar tempo, materiais e sobretudo amostra. Outra vantagem reside no facto de que o ADN em estudo pode estar degradado o que é importante nos casos de vestígios antigos. Actualmente existem numerosos STR's padronizados e comercialmente disponíveis e a sua escolha faz-se com base no seu alto grau de heterozigotia nas populações humanas [Masters e col., 2001]. O nível de probabilidade das conclusões dos relatórios periciais hoje em dia atingido com os sistemas de STR's é muito elevado, ou seja, de valor muito próximo de 100%, dependendo do número de polimorfismos analisado e do número e frequência dos alelos de cada polimorfismo na população.

Polimorfismos de sequência

SNP's - single-nucleotide polymorphism: É uma classe de polimorfismos, actualmente em desenvolvimento. Nestes marcadores as alterações analisadas na sequência do ADN, e não no número de vezes que uma determinada sequência é repetida, consistem na variação de apenas uma base num locus particular conduzindo a dois nucleótidos (alelos) possíveis. Estas variações da sequência de ADN fazem parte das regiões codificantes, podendo portanto afectar a proteína transcrita e assim resultar numa desordem genética [Linacre, 2002]. O primeiro sistema a ser analisado por PCR foi um polimorfismo SNP, o HLA DQ α , em que algumas das bases de uma região contendo 242 pb variam de pessoa para pessoa. Neste sistema as sondas são capazes de detectar seis alelos DQ α . Actualmente o sistema está mais aperfeiçoado (HLA-DQA1) e são analisados mais alelos, designados por DQA1. Com o sistema de detecção

colorimétrico usado obtêm-se uma série de manchas azuis em tiras de papel (*dot blot reverse*).

Os SNP's são menos polimórficos que os STR's mas muito mais abundantes, ocorrendo aproximadamente a cada quilobase do genoma. Através da técnica de PCR é possível detectar polimorfismos específicos individuais mas também analisar grupos próximos num mesmo cromossoma o que aumenta muito o seu potencial informativo. Daí que os sistemas multiplex destes marcadores estejam a ser desenvolvidos para uso em estudos de mapeamento, diagnóstico médico e testes de identidade (particularmente em ADN mitocondrial e do cromossoma Y).

Tabela 1 – Comparação da detecção dos polimorfismos de tipo STR e SNP [adaptado de Linacre e col., 2002].

	STR	SNP
Ocorrência no genoma	~ 1 a cada 15 kb	~1 a cada 1 kb
Métodos de detecção	electroforese por géis de poliacrilamida capilar	biochips deADN
Tempo de análise	2 - 3 h	0.5 – 16 h
Tipo de resultados	número de repetições em cada locus STR	código binário para cada locus
Possibilidade de uso sistema multiplex	10 loci como padrão 16 loci com técnica colorimétrica adicional	> 1000 loci num único chip
Número de alelos para cada locus	5 - 20	normalmente 2
Loci necessários para que o poder de identidade exceda 1 em 1 bilhão	10	50

1.7. PERDA DE HETEROZIGOTIA

O conhecimento dos polimorfismos que estão associados a deficiências ou doenças genéticas, quer por serem de ADN codificante, portanto com expressão fenotípica, quer por serem geneticamente ligados aos genes envolvidos, assume particular importância em Oncobiologia.

Em casos de heterozigotia para um determinado locus (forma informativa) do ADN constitucional detectada através da análise dos marcadores polimórficos do ADN (RFLP's, VNTR's, STR's e SNP's), a observação da perda frequente de um alelo no ADN em alguns tumores (redução à homozigotia), permite colocar a hipótese da presença de um gene supressor tumoral nesta região cromossómica. Esta perda de genes supressores tumorais é um dos mecanismos da carcinogénese e da progressão tumoral, referida como perda de heterozigotia - *Loss of Heterozygosity* (LOH) [Cai e col., 2000; Masters e col., 2001]. Muitos destes loci de possíveis supressores, assim identificados, constituem regiões candidatas a loci de genes de susceptibilidade.

No carcinoma do colo do útero já foi detectada LOH em loci específicos como 3p14.1-p22, 4p16, 6p21, 3p25, 17p13.3 [Clarke e col., 2002] e 11q [Cheung e col., 1999]. No entanto, as alterações no cromossoma 1 são as mais predominantes no carcinoma do colo do útero [Zimonjic e col., 1995]. De facto, Atkin e col., 1997, verificou que em 60% dos tumores do colo do útero que estudou ocorriam rearranjos de um ou mais cromossomas 1. Também o envolvimento deste cromossoma em linhas celulares de carcinoma do colo do útero, imortalizadas por HPV, está associado a alterações específicas da porção distal deste cromossoma, mais concretamente por LOH da região 1p36-35 [Zimonjic e col., 1995]. A região subtelomérica 1p36 sofre deleção em vários tumores e aí se localizam vários marcadores genéticos polimórficos conhecidos. São exemplo o VNTR D1S80, mais distalmente [White e col., 1997], e os STR's D1S2663, D1S507 [Cheung e col., 1999] e, numa localização mais proximal, D1S228 em 1p36.2 [White e col., 1997]. No carcinoma do colo do útero foram encontrados valores percentuais de LOH mais elevados para quatro loci do cromossoma 1 em tumores mais avançados o que sugere que estas alterações devem estar sobretudo relacionadas com a progressão tumoral. Nesta região parecem também localizar-se um ou mais genes supressores tumorais [White 1997], um dos quais é o gene *p73* em 1p36.33.

Os dados acerca da expressão alélica específica dos polimorfismos do gene *p73* são heterogêneos, variando desde 5.3% (marcador no intrão 9) em carcinoma da próstata até 42% (marcador no exão 1) em cancro do pulmão [Cai e col., 2000]. No gene *p73* existe naturalmente um polimorfismo de tipo SNP no exão 2 com dois alelos, consistindo na substituição de dois nucleotídeos G→A e C→T nas posições 4 e 14: os alelos GC e AT. O alelo AT possui um ponto de restrição adicional da enzima *Sty I*, que não existe no alelo GC [Mai e col., 1998; Schittek e col., 1999]. A presença deste polimorfismo já foi demonstrada em carcinomas espinocelulares informativos do pulmão e do esófago [Cai e col., 1999; Mai e col., 1998].

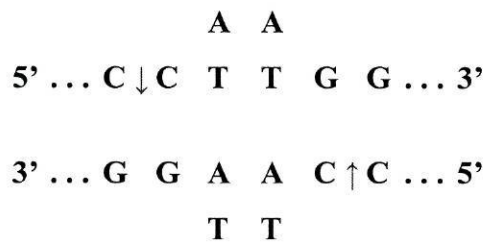


Fig. 10 - Local de restrição da enzima *Sty I* no locus do polimorfismo C/T.

2. HIPÓTESE E OBJECTIVO

O cancro do colo do útero é uma das neoplasias urogenitais mais comuns nas mulheres, constituindo um grande problema de saúde pública. Esta neoplasia apresenta enormes variações nas taxas de incidência e mortalidade a nível mundial. Sendo o HPV globalmente aceite como o agente iniciador na oncogénese desta doença, a compreensão do papel dos vários co-factores genéticos poderá ajudar no esclarecimento da sua etiopatogénese e do seu comportamento biológico.

No presente estudo avaliou-se o papel de alterações no gene *p73* no carcinoma do colo do útero.

As funções exactas da proteína *p73*, bem como a regulação da sua actividade ainda não são bem conhecidas. No entanto, existem evidências crescentes de que esta proteína poderá interferir nos processos de desenvolvimento e na resposta ao dano no ADN. Do mesmo modo que o *p53*, o *p73* parece ser um gene supressor tumoral, participando na indução da apoptose e dos bloqueios nas fases G1 e G2M. A função da

p73 tem vindo a ser cada vez mais implicada no bloqueio em G2M, sobretudo após dano ao ADN por radiação ionizante e por drogas como a ciplastina, que constituem agentes terapêuticos essenciais no carcinoma do colo do útero. Assim, alterações neste gene, nomeadamente pela presença de polimorfismos ou por perda de heterozigotia (com deleção de alelos), poderiam ter um papel relevante na transformação e progressão desta doença.

Até agora não existem quaisquer dados descrevendo as frequências dos genótipos do polimorfismo C/T e a ocorrência de LOH neste locus no carcinoma do colo do útero. Por isso, o objectivo deste estudo consistiu na análise do polimorfismo C/T do exão 2 deste gene e da LOH neste locus para avaliar do papel do gene *p73* na carcinogénese do carcinoma do colo do útero.

3. MATERIAL E MÉTODOS

No Departamento de Radioterapia do Instituto Português de Oncologia do Porto colheram-se 67 biópsias de tumores do colo do útero não tratados e as amostras de sangue periférico respectivas, entre 1997 e 2002. Todas as amostras foram obtidas após consentimento informado de cada doente pelo médico, segundo a Declaração de Helsínquia.

As características clínicas, que incluíam o tipo histológico e o estadio do tumor (este último segundo os critérios da *International Federation of Gynecology and Obstetrics* – FIGO), a idade das doentes à data da menarca, da menopausa e do diagnóstico, o número de gestações e de gravidezes de termo, bem como os dados acerca do uso de contraceptivos orais e hábitos tabágicos, foram obtidas por consulta das fichas clínicas (Quadro 1 e 2). Definiram-se como mulheres de elevada paridade aquelas com três ou mais gravidezes de termo.

As biópsias obtidas eram imediatamente congeladas a -20°C até à data da análise. O ADN da fracção de leucócitos do sangue periférico foi extraído usando um protocolo padrão e a extracção de ADN das biópsias de carcinoma de colo do útero foi realizada com o *High Pure Template Preparation Kit* segundo as instruções do fabricante (*Roche Molecular Biochemicals*).

Para avaliar a presença dos alelos do polimorfismo C/T no exão 2 do gene *p73*, foram amplificadas as amostras de ADN das 67 doentes, por reacção da polimerase em cadeia – *Polymerase Chain Reaction* (PCR) – usando dois primers (5' – CAGGAGGACAGAGCACGAG – 3' e 5' – CGAAGGTGGCTGAGGTAG – 3'), segundo protocolo adaptado de Mai e col., 1998 (Invitrogen). As reacções de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 95°C durante 9 min. para activação da enzima *Taq DNA polymerase*, seguido de 40 ciclos, cada um de 95°C durante 40 seg., 58°C durante 40 seg., 72°C durante 40 seg. e 72°C durante 5 minutos. No final da reacção obtinha-se um fragmento específico de 229 pb confirmado por electroforese num gel com 1.5 % de agarose e marcado com brometo de etídio.

O gene *p73* apresenta um polimorfismo no exão 2 com dois alelos que ocorrem naturalmente: o alelo GC e o alelo AT. O alelo AT tem um local adicional de acção da enzima de restrição *Sty I*, que não existe no alelo GC. A identificação deste polimorfismo foi realizada nas amostras de ADN das 67 biópsias do seguinte modo: 15 µl do produto da PCR eram digeridos durante a noite a 37°C com a enzima de restrição *Sty I*. Depois da digestão, o alelo GC origina um fragmento de 229 pb e o alelo AT dois fragmentos de 157 pb e de 72 pb que eram separados por electroforese num gel com 3% de agarose e marcado com brometo de etídio. Os casos com fragmentos de 229 e 157 ou 72 bp, após digestão pela enzima *Sty I*, eram definidos como informativos, ou seja heterozigóticos, enquanto aqueles que possuíam apenas um tipo de fragmento após a digestão eram considerados homozigóticos. Esta verificação foi realizada por dois observadores.

A pesquisa de casos informativos (heterozigóticos) para análise da perda de heterozigotia foi realizada em ADN de sangue periférico das doentes correspondentes às 67 biópsias. O mesmo procedimento atrás referido foi utilizado para detecção da presença do polimorfismo C/T nas amostras de ADN obtidas a partir do sangue periférico. Nos casos de heterozigotia (genótipo GC/AT) detectada no ADN normal (sangue periférico) foi realizada a comparação com o genótipo encontrado no ADN dos tumores respectivos, permitindo a avaliação da perda de heterozigotia.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa SPSS para *Windows* (versão 7.5). O teste qui-quadrado foi utilizado para comparar variáveis categoriais. O teste t de Student foi utilizado na comparação de variáveis contínuas. A sobrevivência global foi calculada pelo método de Kaplan-Meyer e as diferenças das

sobrevidas globais das doentes foram analisada pelo teste de log-rank. O nível de significância admitido foi de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

A distribuição dos tumores segundo o estadio foi a seguinte: 17.9 % (12) no estadio I, 62.7 % (42) no estadio II e 19.4 % (13) no estadio III. De todos os tumores, 80.6 % (54) foram diagnosticados como carcinomas espinocelulares, 11.9 % (8) como adenocarcinomas (7) ou carcinomas adenoescamosos (1) e os restantes 7.5 % incluíam outros tipos histológicos (5). As fichas clínicas das 67 doentes foram consultadas para avaliação do estado da doença à data final deste estudo. A mediana do tempo de seguimento (*follow-up*) das doentes foi de 36.0 meses (1-64) e o tempo médio de 30.60 meses (SD = 20.15).

No grupo de doentes estudado apenas quatro mulheres referiram hábitos tabágicos, razão pela qual não foi possível analisar este parâmetro.

No Quadro 1 apresentam-se os resultados relativos à análise da idade das doentes. A mediana das idades à data do diagnóstico foi de 47.0 anos (24-73) e a idade média foi de 49.8 anos (SD = 11.8). A idade mediana na menarca foi de 13.0 anos e a idade média de 13.1 anos (SD = 2.2) e na coitarca a mediana das idades foi de 20.0 anos e a idade média de 21.1 anos (SD = 5.5). Em 23 mulheres a idade mediana na menopausa foi de 50.0 anos e a idade média de 46.5 anos (SD = 11.2). Em alguns dos casos não foi possível obter os dados concernentes à idade da menarca (2), da coitarca (9) e da menopausa (2), bem como ao uso de contraceptivos orais (5).

A presença do polimorfismo C/T do exão 2 do gene *p73* no ADN tumoral foi detectada com as seguintes frequências genóticas: 56.7% (38/67) para o genótipo homozigótico GC/GC e 43.3% (29/67) para o genótipo heterozigótico GC/AT. Não foram encontrados casos com genótipo homozigótico para o alelo AT.

Estudou-se a associação da presença dos genótipos GC/GC e GC/AT nos tumores e a idade média à data do diagnóstico (49.3 ± 12.5 anos e 50.4 ± 11.0 anos), da menarca (13.6 ± 2.2 anos e 12.5 ± 2.1 anos), da coitarca (20.6 ± 5.4 anos e 21.9 ± 5.7 anos) e da menopausa (48.2 ± 5.3 anos e 44.3 ± 16.1 anos). Analisando estas diferenças

verificou-se a associação significativa da presença do genótipo GC/AT nos tumores de doentes cuja menarca ocorreu mais cedo ($p = 0.039$). Não foi encontrada qualquer associação com a idade à data do diagnóstico ($p = 0.715$), da coitarca ($p = 0.397$) ou da menopausa ($p = 0.426$).

Quadro 1 - Associação dos genótipos do polimorfismo C/T com a idade das doentes.

Idade (anos)	Total		Genótipo	Genótipo	p^a
	Mediana	Média \pm SD	GC/GC	GC/AT	
			Média \pm SD	Média \pm SD	
Idade no diagnóstico	47.0	49.8 \pm 11.8	49.3 \pm 12.5	50.4 \pm 11.0	0.715
Idade na menarca	13.0	13.1 \pm 2.2	13.6 \pm 2.2	12.5 \pm 2.1	0.039
Idade na coitarca	20.0	21.1 \pm 5.5	20.6 \pm 5.4	21.9 \pm 5.7	0.397
Idade na menopausa	50.0	46.5 \pm 11.2	48.2 \pm 5.3	44.3 \pm 16.1	0.426

^aTeste t de Student

No Quadro 2 apresentam-se os resultados relativos à associação dos genótipos GC/GC e GC/AT com cinco variáveis clínico-patológicas. A frequência do genótipo GC/AT foi predominante nas mulheres com elevada paridade, relativamente àquelas doentes com baixa paridade (60,7% vs.30,8%; $p = 0.015$). Quando se analisou o número de gestações, as diferenças na incidência do genótipo GC/GC e do genótipo GC/AT não foram significativas ($p = 0.139$): 48.6 % e 51.4 % em mulheres com 3 ou mais gestações; 66.7 % e 33.3 % em doentes com menos de 3 gestações, respectivamente. Os genótipos GC/GC e GC/AT estiveram presentes respectivamente em 53.7% e 46.3% dos carcinomas espinocelulares, 62.5% e 37.5% dos adenocarcinomas e dos carcinomas adenoescamosos e em 80.0% e 20.0% das restantes histologias. Estas diferenças não foram significativas ($p = 0.493$). Não houve associação significativa entre o estadió tumoral e a presença dos genótipos GC/GC e GC/AT ($p = 0.529$): 50.0 % e 50.0 % para o estadió I; 61.9 % e 38.1 % para o estadió II; 46.1 e 53.8 % para o estadió III. Também não se encontrou qualquer associação significativa ($p = 0.894$) entre a presença dos genótipos GC/GC e GC/AT e o uso de contraceptivos orais: 53.8 % e 46.2 % em

doentes que usaram contraceptivos orais vs. 55.6 % e 44.4 % no grupo de doentes que nunca usaram contraceptivos orais, respectivamente.

Quadro 2 - Associação entre o polimorfismo C/T e cinco variáveis clínico-patológicas nas doentes com carcinoma do colo do útero.

		Genótipo GC/GC		Genótipo GC/AT		p ^a
		Nº	(%)	Nº	(%)	
Contraceptivos orais	sim	14	53.8	12	46.2	0.894
	não	20	55.6	16	44.4	
Nº de gestações	< 3	20	66.7	10	33.3	0.139
	≥ 3	18	48.6	19	51.4	
Paridade*	< 3	27	69.2	12	30.8	0.015
	≥ 3	11	39.3	17	60.7	
Estadio tumoral	I	6	50.0	6	50.0	0.529
	II	26	61.9	16	38.1	
	III	6	46.1	7	53.8	
Histologia tumoral	E	29	53.7	25	46.3	0.493
	A	5	62.5	3	37.5	
	Outras	4	80.0	1	20.0	

E – carcinoma espinocelular; A – adenocarcinoma e carcinoma adenoescamoso

*Nº de gravidezes de termo

^aTeste de qui-quadrado

O estudo da sobrevivência cumulativa permitiu verificar que aquelas doentes cujos tumores apresentavam o genótipo homocigótico GC/GC apresentavam uma sobrevivência média de 56.30 meses (50.04 – 62.57 meses) enquanto no grupo com genótipo heterocigótico GC/AT a sobrevivência média foi de 58.43 meses (52.27 – 64.59 meses). Estas diferenças não foram estatisticamente significativas, $p = 0.828$.

Para avaliar a perda de heterocigotia analisaram-se as amostras de ADN do sangue periférico quanto a este polimorfismo C/T. Foram encontrados 28 casos heterocigóticos que eram os informativos quanto à análise da perda de heterocigotia. Só

foi possível encontrar um resultado conclusivo em 25 casos. Nestes casos a distribuição dos estadios tumorais foi de: 20.0% (5) para o estadio I, 60.0% (15) para o estadio II e 20.0% (5) para o estadio III. De todos os tumores, 68.0% (17) foram diagnosticados como carcinomas espinocelulares, 20.0% (5) como adenocarcinomas e os restantes 12.0% (3) incluíram outras histologias.

Concluiu-se que em 20.0% (5/25) das amostras tumorais o alelo AT do ADN tinha sido perdido, em comparação com o ADN do sangue periférico normal respectivo. No Quadro 3 são apresentados os resultados relativos à análise da idade dos casos de heterozigotia. A idade mediana à altura do diagnóstico foi de 49.0 anos e a idade média de 48.9 (SD = 10.3).anos. A idade mediana da menarca foi de 12.5 anos e a idade média de 12.9 (SD = 2.0) anos e a idade mediana da coitarca foi de 20.5 anos e a idade média de 20.4 (SD = 2.1) anos. A mediana das idades na menopausa foi de 49.5 anos e a idade média foi de 48.5 (SD = 6.5) anos. Quanto à associação da presença ou perda do alelo AT a média das idades à altura do diagnóstico foi respectivamente de 49.6 ± 11.2 anos vs. 46.2 ± 5.0 anos, na menarca foi de 12.7 ± 2.1 anos vs. 13.4 ± 1.7 anos, na coitarca foi de 20.6 ± 2.1 anos vs. 19.8 ± 1.3 anos e na menopausa foi de 47.7 ± 6.8 anos vs. 52.0 anos em apenas uma doente. Analisando estas diferenças não se encontrou qualquer associação significativa.

Quadro 3 - Associação da presença ou perda do alelo AT no locus *p73* com a idade das doentes.

Idade (anos)	Total		Presença do alelo AT	Perda do alelo AT	p ^a
	Mediana	Média ± SD	Média ± SD	Média ± SD	
Idade no diagnóstico	49.0	48.9 ± 10.3	49.6 ± 11.2	46.2 ± 5.0	0.514
Idade na menarca	12.5	12.9 ± 2.0	12.7 ± 2.1	13.4 ± 1.7	0.527
Idade na coitarca	20.5	20.4 ± 2.1	20.6 ± 2.1	19.8 ± 1.3	0.444
Idade na menopausa	49.5	48.5 ± 6.5	47.7 ± 6.8	52.0	0.576

^aTeste t de Student

No Quadro 4 está registada a associação das frequências da presença ou perda do alelo AT relativamente aos parâmetros clínico-patológicos estudados: histologia e estadio tumorais, número de gestações e paridade. Verificou-se que existe associação significativa entre a perda do alelo AT e a paridade (0.041). Estes resultados demonstram que as mulheres de elevada paridade mantiveram o alelo AT ao contrário do grupo de baixa paridade em que ocorreu a perda do alelo AT no tumor de 33.3% das doentes. Quando se analisou o número de gestações, estas diferenças quanto à presença ou perda do alelo AT não foram significativas, $p = 0.420$. A distribuição dos tumores com presença ou perda do alelo AT segundo o tipo histológico foi respectivamente: 88.2% e 11.8% dos carcinomas espinocelulares, 80.0% e 20.0% dos adenocarcinomas e 33.3% e 66.7% das outras histologias. Estas diferenças não foram significativas ($p = 0.091$). Também não foi significativa a associação entre o estadio tumoral e a presença ou perda do alelo AT ($p = 0.287$). Não se registou qualquer outra associação entre a perda de heterozigotia e os restantes parâmetros avaliados.

Quadro 4 - Associação entre a presença e a perda do alelo AT no locus *p73* e quatro variáveis clínico-patológicas nas doentes com carcinoma do colo do útero.

		Presença do alelo		Perda do alelo		p^a
		AT		AT		
		Nº	(%)	Nº	(%)	
Nº gestações	< 3	8	72.7	3	27.3	0.420
	≥ 3	12	85.7	2	14.3	
Paridade*	< 3	10	66.7	5	33.3	0.041
	≥ 3	10	100.0	0	0.0	
Estadio tumoral	I	3	60.0	2	40.0	0.287
	II	12	80.0	3	20.0	
	III	5	100.0	0	0.0	
Histologia tumoral	E	15	88.2	2	11.8	0.091
	A	4	80.0	1	20.0	
	Outras	1	33.3	2	66.7	

E – carcinoma espinocelular; A – adenocarcinoma e carcinoma adenoescamoso

*Nº de gravidezes de termo; ^aTeste de qui-quadrado

5. DISCUSSÃO

O mecanismo da carcinogénese do cancro do colo do útero não está bem esclarecido. Este estudo é o primeiro que avalia o papel dos polimorfismos do gene *p73* no cancro do colo do útero.

O *p73*, ao contrário do *p53*, é funcionalmente inactivado pela proteína E6 dos HPV's de alto e de baixo risco, por um mecanismo diferente que não envolve a degradação pela via da ubiquitina, e que pode ter um papel importante respectivamente na transformação maligna e na formação de condilomas benignos do colo do útero. A proteína E6 liga-se à *p73* inibindo a activação do *p21^{WAF1}* mediada pelo *p73*. O *p21* constitui um alvo da *p53* e é responsável pela paragem em G1 mediada por esta proteína, proporcionando assim uma vantagem na carcinogénese do colo do útero [Park e col., 2001]. A proteína oncogénica E7 do HPV é capaz de se associar à proteína pRb, produto do gene *pRb*, inactivando-a e causando a libertação do factor E2F1, com subsequente expressão dos genes que controlam a proliferação celular [Brooks e col., 2002].

O factor de transcrição E2F1 induz a progressão do ciclo celular e a apoptose para a qual usa tanto a via dependente como a independente do *p53* [Irwin e col., 2000]. A via de morte celular dependente do *p53* envolve a indução pelo E2F1 da proteína supressora tumoral 14ARF, que neutraliza a HDM2, assim estabilizando a proteína *p53* [Irwin e col., 2000] por inibição da degradação da *p53* dependente do *HDM2*, e facilitando a apoptose e o bloqueio do ciclo celular induzidos pelo *p53* [Brooks e col., 2002]. A *p73* é activada pelo E2F1 para induzir a apoptose na ausência do *p53* e do *pRb*. De facto, já foram encontrados altos níveis da proteína *p73* em células com a pRb inactivada (portanto com os genes que respondem ao E2F desreprimidos) pelo antigénio SV40 T ou pela proteína E1A adenovírica [Irwin e col., 2000]. A forte associação entre a expressão desregulada do *14ARF* e do *p73* nas lesões neoplásicas intraepiteliais cervicais de grau III (CIN III) e nos carcinomas espinocelulares é claramente consistente com esta via de activação da expressão dependente do *E2F1* [Brooks e col., 2002]. Por outro lado foi demonstrado em células deficientes em *p73*, testadas com radiação γ e cisplatina, que este gene também é necessário para a via de apoptose dependente do *p53* [Flores e col., 2002]. Poderia existir conexão entre as duas moléculas uma vez que as funções de transactivação e pró-apoptóticas da *p73* são

reguladas pela p53 mutada [Soengas e col., 2000]. Parece que a p53 que apresenta o alelo Arg no codão 72 seria capaz de se complexar e inactivar mais eficazmente a p73 α e β [Marin e col., 2000; Anzola e col., 2003; Soengas e col., 2000; Kaelin, 1999].

Na ausência do p53, a p73 também constitui um alvo da c-Abl, uma tirosina cinase não receptora, em resposta ao dano do ADN induzido por agentes quimioterapêuticos, como a cisplatina [Gong e col., 1999], e pela radiação γ , portanto de um modo independente do p53 [Agami e col., 1999; Yuan e col., 1999]. A c-Abl fosforila a p73, depois de activada pela proteína do gene *ATM* em resposta ao dano ao ADN induzido [White e col., 1999], por radiação γ em fibroblastos de ratinhos [Agami e col., 1999] e com um máximo 6 horas após uma dose de radiação X de 4 Gy no citoplasma de células germinativas [Hamer e col., 2001], o que resulta em morte celular por apoptose.

A p73 é capaz de activar o gene *14-3-3 σ* , que medeia o bloqueio em G2M dependente do p53, dum modo 3-6 vezes mais eficaz do que pela p53 [Zhu e col., 1998]. A proteína deste gene interactua com a fosfatase cdc25 para bloquear a activação da cinase cdc2 dependente da ciclina B, que é necessária para a iniciação da mitose, conduzindo ao bloqueio em G2M [Zhu e col., 1998; Qin e col., 2003]. Por outro lado, é possível que o gene p73 esteja também envolvido na activação de outros genes responsáveis pelo bloqueio em G2M, como o *GADD45*, em resposta à radiação γ uma vez que este bloqueio continua a existir nas células deficientes em p53 [Fei e col., 2002].

A região 1p36.3, onde se localiza o gene p73, sofre frequentemente deleção com perda de heterozigotia, em vários tumores humanos, incluindo neuroblastoma, feocromocitoma, oligodendroglioma, melanoma, tumor das células de Merkel, de células germinativas, da mama, do fígado e do cólon, bem como em algumas lesões pré cancerosas como os adenomas colorectais [Schulteis e col., 1999]. A partir de dados imunocitoquímicos verificou-se que a p73 está confinada às camadas basais e suprabasais no epitélio cervical normal e se encontra disseminada em lesões neoplásicas. A sua expressão aumenta com o grau de malignidade e atinge o máximo no carcinoma espinocelular [Brooks e col., 2002].

Neste trabalho analisou-se a presença do polimorfismo C/T do exão 2 do gene p73 e a perda de heterozigotia no mesmo locus em carcinoma do colo do útero em que não havia dados publicados. Alterações deste polimorfismo, nomeadamente devidas a perda alélica por LOH, poderiam ser responsáveis por diferenças de expressão da p73

em tumores vs. tecido normal. Os nossos resultados mostram uma associação significativa entre a presença do genótipo heterozigótico GC/AT no tumor e idade inferior à data da menarca ($p = 0.039$), bem como a paridade elevada ($p = 0.015$). Na análise da LOH, verificou-se a perda do alelo AT do polimorfismo CT do gene *p73* em 20.0% das biópsias de carcinoma do colo do útero nos casos informativos. Os resultados obtidos demonstram que o alelo AT se manteve no tumor de todas as doentes com paridade elevada ao contrário do grupo de baixa paridade em que ocorreu a perda do alelo AT no tumor de 33.3% das doentes ($p = 0.041$).

Até à data não existem evidências experimentais acerca das diferenças funcionais entre os alelos GC e AT [Kaghad e col., 1997] mas a presença deste polimorfismo no exão 2 do gene *p73* poderia originar alterações na expressão ou na função da proteína *p73* à semelhança do que ocorre no gene *p53*. Neste caso demonstrou-se que a existência de um polimorfismo no codão 72 do exão 4, que codifica tanto um aminoácido Prolina como um Arginina, condiciona a produção de variantes da proteína *p53* funcionalmente distintas, nomeadamente quanto à eficácia na indução da apoptose [Dumont e col., 2003]. No caso do polimorfismo C/T do gene *p73* parece existir predominância da presença do alelo AT em mulheres com elevada paridade com carcinoma invasivo de colo do útero.

A elevada paridade tem sido associada com o cancro do colo do útero desde 1931 [Autier e col., 1996] mesmo tendo em conta o HPV. De facto as mulheres nulíparas têm menor risco de desenvolverem carcinoma espinocelular do colo do útero do que as que tiveram filhos e, entre estas, o risco aumenta com o número de gravidezes de termo [Muñoz e col., 2002]. O declínio da multiparidade, que tem vindo a ocorrer nas últimas décadas na maior parte dos países desenvolvidos ou em vias de desenvolvimento, está de acordo com estes dados e poderia ser em parte responsável pelo decréscimo na incidência e mortalidade do cancro do colo do útero [Muñoz e col. 2002; Autier e col., 1996]. A associação encontrada entre o risco de carcinoma do colo do útero e o número de gravidezes de termo e não com o número de abortos sugere que os eventos relacionados com o segundo e o terceiro trimestres de gravidez ou com o parto poderiam ser relevantes [Brinton e col., 1989; Muñoz e col., 2002]. Por outro lado, a concentração de estrogénios e progesterona no sangue aumenta progressivamente durante a gravidez atingindo os níveis mais altos nas últimas semanas [Muñoz e col., 2002]. Estas alterações hormonais são provavelmente responsáveis pela eversão do epitélio colunar para o ectocérvix, denominada de ectopia cervical, na zona

de transformação, dentro da qual se situa a linha de junção entre o epitélio colunar de uma única camada de células secretoras de muco do endocérvix e o epitélio pavimentoso estratificado e não queratinizante do ectocérvix [Muñoz e col., 2002; Autier e col., 1996; Tsutsumi e col., 1993]. A zona de transformação é visível no ectocérvix em virtualmente todas as mulheres adolescentes ou de idade mais jovem (94% das mulheres com menos de 25 anos) e regride para o endocérvix com o avançar da idade (50% das mulheres com menos de 45 anos e apenas 2% das mulheres com mais de 64 anos) [Muñoz e col., 2002; Autier e col., 1996; Critchlow e col., 1995].

A ectopia cervical é maior nas mulheres que tiveram filhos. Começa logo no início da gravidez e é mais pronunciada durante o segundo e terceiro trimestres, aumentando com o número de gravidezes com um factor de 3.3 nas mulheres que tiveram cinco ou mais filhos [Autier e col., 1996].

A metaplasia escamosa da zona de transformação ocorre durante o desenvolvimento e a maturação sexual aparentemente como uma resposta adaptativa [Elson e col., 2000] e aumenta também durante a gravidez até atingir o máximo no terceiro trimestre [Muñoz e col., 2002].

As evidências do efeito adverso da gravidez no risco de cancro do colo do útero provêm da detecção de anomalias cervicais entre as mulheres grávidas, possivelmente devido a este fenómeno de migração do endocérvix durante a gravidez [Brinton e col., 1989]. A paridade elevada mantém a zona de transformação no ectocérvix durante muitos anos, assim facilitando a exposição directa ao HPV e seus co-factores [Muñoz e col., 2002]. Consistente com esta origem é o facto de que mais de 90% das lesões induzidas por HPV e dos carcinomas cervicais, 80% dos quais são carcinomas espinocelulares [Schiffman e col., 1995], terem o seu início na zona de transformação, o local genital mais sensível aos estrogénios [Autier e col., 1996; Jin e col., 1999].

A hormona estrogénio tem sido implicada na carcinogénese e foi finalmente declarada como carcinogénio humano pelo *National Toxicology Program* dos E.U.A. no final do ano de 2002. Os estrogénios podem promover o cancro sinalizando a proliferação em células com mutações genéticas que se podem tornar malignas, multiplicando-se sem controlo [Miller, 2003]. Para além disso as células normais de mamífero podem tornar-se cancerosas por sofrerem mutações enquanto metabolizam os estrogénios. Isto acontece no processo de hidroxilação dos estrogénios e subsequente metilação para formar catechol e estrogénios metoxilados. Os estrogénios de tipo catechol, entre os quais a 4-hidroxiestrone e o 16 α -hidroxiestradiol são considerados

carcinogénicos com capacidade de metabolização redox cíclica contínua. Neste processo produzem-se intermediários de quinonas como metabolitos. A actividade genotóxica dos estrogénios é devida à ligação covalente destes intermediários ao ADN, retirando uma base do nucleotídeo – depurinação – com a subsequente formação de locais apurínicos altamente mutagénicos [Cavaliere e col., 2000; Gruber e col., 2002; Miller, 2003]. Os metabolitos dos estrogénios de tipo catechol assim produzidos podem também gerar radicais livres que danificam o ADN, contribuindo substancialmente para a capacidade dos estrogénios como iniciadores do processo carcinogénico. Os cancros relacionados com os estrogénios ocorrem precisamente naqueles tecidos que produzem as enzimas responsáveis pela transformação do estradiol no primeiro metabolito dos estrogénios de tipo catechol [Miller, 2003].

A demonstração do aumento da 16 α -hidroxilação do estradiol em 16 α -hidroxiestrone sugeriu a activação sinérgica da proliferação celular. Isto deve-se à desregulação do ciclo celular pelas proteínas virais oncogénicas e à sinalização dos receptores de estrogénios, prolongando o efeito dos estrogénios [Elson e col., 2000; de Villiers, 2003; Jin e col., 1999]. A 16 α -hidroxiestrone liga-se covalentemente ao receptor de estrogénio na zona de transformação do colo do útero, altamente sensível aos estrogénios, na presença de uma infecção por HPV de alto risco. Tal como a 16 α -hidroxiestrone, os estrogénios e a progesterona aumentam a apoptose dependente do *p53* e induzida pelas E2 e E7, que interagem com a *p53* e com o complexo pRb-E2F. Este efeito não ocorre na presença da proteína E6, que se pode ligar à *p53*, promovendo a sua degradação pela via da ubiquitina [de Villiers, 2003] e à *p73*, inactivando a sua função de transactivação, independentemente da sua actividade de ligação ao ADN [Park e col., 2001]. Pode-se colocar a hipótese de que o polimorfismo do gene *p73* (que se localiza no exão 2, dentro da região TAD) conduz a alterações na afinidade da proteína E6 para a *p73*, de um modo semelhante ao que acontece no polimorfismo no codão 72 do exão 4 do gene *p53*.

Outra linha de evidência sugere que a interacção entre a *p53* e a *p73* é intensificada pelo aminoácido Arg do polimorfismo do codão 72 da *p53* [Marin e col., 2000], o que pode neutralizar a apoptose induzida pela *p73*. Assim, sugerimos que os polimorfismos do gene *p73* podem influenciar esta interacção tal como a função da *p73* na regulação da entrada dos estrogénios no núcleo e sua ligação aos receptores de estrogénios já demonstrada no útero de cabra [Padma e col., 2000].

Na interacção com outros genes, a existência de haploinsuficiência no gene *p73*, em consequência de deleção, juntamente com a possível inactivação do outro alelo, poderia conduzir a complexos disfuncionais ou perda de função capazes de contribuir para o desenvolvimento tumoral [Soengas e col., 2000].

Resumindo, todos estes dados são consistentes com os presentes resultados e sugerem a interferência do *p73* no carcinoma do colo do útero. Assim, coloca-se a hipótese de que as alterações no gene *p73*, nomeadamente pela presença de polimorfismos, poderiam ter um papel relevante na génese e/ou progressão do carcinoma do colo do útero, particularmente na zona de transformação, em mulheres infectadas com HPV e expostas durante muito tempo aos estrogénios devido a menarca precoce e paridade elevada.

6. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os nossos resultados demonstram a presença preferencial do genótipo heterozigótico GC/AT do polimorfismo C/T do exão 2 do gene *p73*, em ADN de biópsias do carcinoma do colo do útero, em mulheres cuja menarca ocorreu em idade mais precoce e com elevada paridade. Por outro lado, verificou-se que o alelo AT se manteve no tumor em todas as doentes com elevada paridade, comparativamente com o tecido normal, em situações de heterozigotia. Este facto sugere que as alterações no gene *p73* possam estar relacionadas de algum modo com a exposição prolongada a estrogénios das células infectadas por HPV. Os estrogénios poderiam actuar como co-factores, influenciando a persistência da infecção vírica, que constitui o factor essencial para o desenvolvimento do carcinoma do colo do útero. A sua capacidade de induzir danos no ADN e também a proliferação celular poderia ser relevante na transformação e progressão maligna das células sensíveis a estrogénios da zona de transformação, onde a maioria dos carcinomas do colo do útero têm origem, e já sujeitas a desregulação do ciclo celular e da apoptose induzida pelo HPV.

O estudo da influência do gene *p73* e das suas alterações no carcinoma do colo do útero encontra-se na sua fase inicial. Para a continuação da investigação nesta área propomo-nos futuramente reforçar este estudo englobando várias perspectivas:

O primeiro passo inclui o desenvolvimento de um estudo coorte com uma amostra alargada a maior número de doentes e a definição de um grupo controlo de mulheres sem doença. Este passo também ajudará a esclarecer acerca da interferência dos hábitos tabágicos e do uso de anticoncepcionais orais como co-factores no carcinoma do colo do útero. Mais ainda, a determinação das frequências dos genótipos do polimorfismo C/T do gene *p73* nas mulheres da população normal e nas doentes com carcinoma colo do útero, será de grande utilidade na eventual relação do polimorfismo como factor de risco na susceptibilidade ao desenvolvimento desta doença;

Como a deleção da região 1p36.3, onde o gene *p73* se localiza, é frequente em vários tumores humanos, seria interessante a análise de outros marcadores aí localizados, de entre os quais se salienta o D1S80;

Tendo em conta que o gene *p73* possui várias isoformas o seu reconhecimento contribuiria para o esclarecimento do seu papel no carcinoma do colo do útero;

Uma vez que é bem conhecido o acúmulo de células em G2M em resposta ao dano ao ADN induzido por radiação ionizante e que existem evidências crescentes do envolvimento do gene *p73* neste ponto de verificação celular, tal como na resposta à cisplatina, seria interessante analisar as alterações ocorridas neste gene, em biópsias de carcinoma do colo do útero antes e após o tratamento com radioterapia e/ou cisplatina;

Dada a importância do gene *p53* como guardião celular nos processos de progressão da proliferação ou da entrada em apoptose, de um modo que pode ser dependente ou independente do gene *p73*, o estudo do estado do *p53* poderia contribuir para o entendimento da dinâmica da interrelação dos dois genes nesta doença;

O estudo das alterações do gene *p73* em lesões pré neoplásicas e sua comparação com a presença HPV poderia ajudar no esclarecimento acerca do modo de actuação deste agente patogénico e sua inter-actuação com os outros co-factores no desencadear do processo de transformação e progressão do colo do útero.

Em conclusão, os resultados por nós obtidos dão indicações para a continuação do projecto iniciado. O estudo do *p73* no carcinoma do colo do útero parece de grande interesse para uma melhor compreensão desta neoplasia.

7. BIBLIOGRAFIA

Agami R, Blandino G, Oren M, Shaul Y. Interaction of c-Abl and p73 α and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* 1999;399:809-13.

Anzola M, Cuevas N, Martínez-López M, Saiz A, Burgos JJ, De Pancorbo MM. Frequent loss of p53 codon 72 Pro variant in hepatitis C virus-positive carriers with hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* 2003;193:199-205.

Atkin NB. Cytogenetics of carcinoma of the cervix uteri: a review. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;95:33-9.

Auborn KJ, Woodworth C, Di Paolo JA, Bradlow HL. The interaction between HPV infection and estrogen metabolism in cervical carcinogenesis. *Int J Cancer* 1991;49:867-9.

Autier P, Coibion M, Huet F, Grivegnee AR. Transformation zone location and intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Br J Cancer* 1996;74:488-90.

Bayo S, Bosch FX, De Sanjosé S, Muñoz N, Combita AL, Coursaget P, Diaz M, Dolo A, Van den Brule AJC, Meijer CJM. Risk factors of invasive cervical cancer in Mali. *Int J Epidemiol* 2002;31:202-9.

Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D. A human genetics primer. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer*. USA: McGraw-Hill Companies, Inc., 1995; pp3-31.

Bouvard V, Zaitchouk T, Vacher M, Duthu A, Canivet M, Choisy-Rossi C, Nieruchalski M, May E. Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionizing irradiation in mice. *Oncogene* 2000;19:649-60.

Bravo I, Sansonetty F, Craveiro R, Bento MJ, Figueiredo G, Vieira E. Alteration of Ki-67, DNA content and cell cycle distribution during radiotherapy for cervix cancer. *Rad Oncol Invest* 1995;3:34-41.

Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, Herrero R, De Britton RC, Gaitan E, Tenorio F, Garcia M, Rawls WE. Parity as a risk factor for cervical cancer. *Am J Epidemiol* 1989;130(3):486-96.

Brooks LA, Sullivan A, O'Nions J, Bell A, Dunne B, Tidy JA, Evans DJ, Osin P, Vousden KH, Gusterson B, Farrell PJ, Storey A, Gasco M, Sakai T, Crook T. E7 proteins from oncogenic human papillomavirus types transactivate p73: role in cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2002;86:263-8.

Cai YC, Yang G-y, Nie Y, Wang L-D, Zhao X, Song Y-l, Seril DN, Liao J, Xing EP, Yang CS. Molecular alterations of *p73* in human esophageal squamous cell carcinomas: loss of heterozygosity occurs frequently; loss of imprinting and elevation of *p73* expression may be related to defective p53. *Carcinogenesis* 2000;21(4):683-9.

Cavalieri E, Frenkel K, Liehr JG, Rogan E, Roy D. Chapter 4: estrogens as endogeneous genotoxic agents – DNA adducts and mutations. *J Natl Cancer Inst: Monographs* 2000;27:75-93.

Cheung TH, Chung TKH, Poon CS, Hampton GM, Wang VW, Wong YF. Allelic loss on chromosome 1 is associated with tumor progression of cervical carcinoma. *Cancer* 1999;86:1294-8.

Chu T-Y, Shen C-Y, Lee H-S, Liu H-S. Monoclonality and surface lesion-specific microsatellite alterations in premalignant and malignant neoplasia of uterine cervix: a local field effect of genomic instability and clonal evolution. *Genes, Chrom. & Genes* 1999;24:127-34.

Clarke B, Chetty R. Postmodern cancer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2002;55:19-24.

Clurman B, Groudine M. Killer in search of a motive? *Nature* 1997; 389:122-3.

Coleman CN, Stevenson MA, Bump E, Calderwood S, Palayoor S, Price B, Shafman TD. Molecular and cellular biology. In: Gunderson LL, Tepper JE, editors. *Clinical radiation oncology*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000; pp42-63.

Critchlow CW, Wölner-Hanssen P, Eschenbach DA, Kiviat NB, Koutsky LA, Stevens CE, Holmes KK. Determinants of cervical ectopia of cervicitis: age, oral contraception, specific cervical infection, smoking, and douching. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173(2):534-43.

De Villiers E-M. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Int J Cancer* 2003;103:705-8.

Dumont P, Leu JI-J, Della Pietra III AC, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Gen* 2003;33:356-65.

Elson DA, Riley RR, Lacey A, Thordarson G, Talamantes FJ, Arbeit JM. Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. *Cancer Res* 2000;60:1267-75.

Fei P, Bernhard EJ, El-Deiry WS. Tissue-specific induction of p53 targets *in vivo*. *Cancer Res* 2002;62:7316-27.

Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, McKeon F, Jacks T. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* 2002;416:560-4.

Franco EL, Duarte-Franco E, Frenzy. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Can Med Assoc J* 2001;164(7):1017-25.

Gong JG, Costanzo A, Yang H-Q, Melinos G, Kaelin WG, Levrero M, Wang JYJ. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 1999;399:806-9.

Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *New Eng J Med* 2002;346(5):340-52.

Hall EJ. *Radiobiology for the radiologist*. Philadelphia. Lippincott & Wilkins, 2000.

Hamer G, Gademan IS, Kal HB, De Rooij DG. Role for c-Abl and p73 in the radiation response of male germ cells. *Oncogene* 2001;20:4298-304.

Han S, Semba S, Abe T, Makino N, Furukawa T, Fukushige S, Takahashi H, Sakurada A, Sato M, Shiiba K, Matsuno S, Nimura Y, Nakagawara A, Horii A. Infrequent somatic mutations of the *p73* gene in various human cancers. *Eur J Surg Oncol* 1999;25:194-8.

Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, Whitaker NJ, Scheffner M. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(3):1218-23.

Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Wacholder S, Bratti MC, Sherman ME, Lorincz AT, Burk RD, Morales J, Rodriguez AC, Helgesen K, Alfaro M, Hutchinson M, Balmaceda I, Greenberg M, Schiffman M. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer* 2001;84(9):1219-26.

Howley PM, Ganem D, Kieffz E. DNA viruses. In De Vita VT, Hellman S, Rosenberg AS. *Cancer principles & practice of oncology*. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, 2001; pp 158-77.

Ichimiya S, Nimura Y, Kageyama H, Takada N, Sunahara M, Shishikura T, Nakamura Y, Sakiyama S, Seki N, Ohira M, Kaneko Y, McKeon F, Caput D, Nakagawara A. p73

at chromosome 1p36.3 is lost in advanced stage neuroblastoma but its mutation is infrequent. *Oncogene* 1999;18:1061-6.

Irwin M, Marin MC, Phillips AC, Seelan RS, Smith DI, Liu W, Flores ER, Tsai KY, Jacks T, Vousden KH, Kaelin WG. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 2000;407:645-8.

Irwin M, Kaelin WG. p53 family update: p73 and p63 develop their own identities. *Cell Growth Differ* 2001;12:337-49.

Janicek MF, Averette HE. Cervical cancer: prevention, diagnosis, and therapeutics. *Cancer J Clin* 2001;51(2):92-114.

Jin L, Qi M, Chen D-Z, Anderson A, Yang G-Y, Arbeit JM, Auborn KJ. Indole-3-carbinol prevents cervical cancer in human papilloma virus type 16 (HPV16) transgenic mice. *Cancer Res* 1999;59:3991-7.

Jost CA, Marin MC, Kaelin WG. p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 1997;389:191-4.

Kadish AS, Timmins P, Wang Y, Ho GYF, Burk RD, Ketz J, He W, Romney SL, Johnson A, Angeletti R, Abadi M, The Albert Einstein Cervix Dysplasia Clinical Consortium. Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus (HPV) infection is associated with cell-mediated immune responses to an HPV type 16 E6 peptide. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2002;11:483-8.

Kaelin WG. The p53 gene family. *Oncogene* 1999;18:7701-5.

Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan J-C, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias J-M, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997;90:809-19.

Kjellberg L, Hallmans G, Åhren A-M, Johansson R, Bergman F, Wadell G, Ångström T, Dillner J. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer* 2000;82(7):1332-8.

Lacey JV, Brinton LA, Barnes WA, Gravitt PE, Greenberg MD, Hadjimichael OC, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Kurman RJ, Hildesheim A. Use of hormone replacement therapy and adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2000;77:149-54.

Masters JR, Thomson JA, Daly-Burns B, Reid YA, Dirks WG, Packer P, Toji LH, Ohno T, Tanabe H, Arlett CF, Kelland LR, Harrison M, Virmani A, Ward TH, Ayres KL, Debenham PG. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard. *Levrero M, de Laurenzi V, Costanzo A, Sabatini S, Gong J, Wang JYJ, Melino G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. J Cell Sci* 2000;113:1661-70.

Linacre A, Graham D. Role of molecular diagnostics in forensic science. *Expert Rev Mol Diagn* 2002;2(4):346-53.

Ljungman M. Individual variation in p53 responsiveness. *J Natl Cancer Inst* 2001:82-3.

Mai M, Yokomizo A, Qian C, Yang P, Tindall DJ, Smith DI, Liu W. Activation of p73 silent allele in lung cancer. *Cancer Res* 1998;58:2347-9.

Marin MC, Jost CA, Brooks LA, Irwin MS, O'Nions J, Tidy JA, James N, McGregor JM, Harwood CA, Yulug IG, Vousden KH, Allday MJ, Gusterson B, Ikawa S, Hinds PW, Crook T, Kaelin WG. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet* 2000;25(1):47-54.

Martinez AA, Gunderson LL. Gynecologic tumors. In: Gunderson LL, Tepper JE, editors. *Clinical radiation oncology*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000; pp.879-85. for human cell lines. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98(14):8012-7.

Medeiros-Melo-Silva R. Polimorfismos genéticos, susceptibilidade para cancro da próstata e risco de metastização. Tese de Doutoramento. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto 2002.

Merrit AJ, Allen TD, Potten CS, Hickman J. Apoptosis in small intestinal epithelia from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after γ -irradiation. *Oncogene* 1997;14:2759-66.

Miller K. Estrogen and DNA damage: the silent source of breast cancer? *J Natl Cancer Inst* 2003;95(2):100-2.

Moreno V, Bosch FX, Muñoz M, Meijer CJLM, Shah KV, Walboomers JMM, Herrero R, Franceschi S. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002;359:1085-92.

Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJLM, Bosch FX. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002;359:1093-101.

Padma S, Renil M, Varman Thampan R. Protein-protein interactions that precede the nuclear entry of goat uterine estrogen receptor under cell-free conditions. *J Cell Biochem* 2000;78(4):650-65.

Park J-S, Kim E-J, Lee J-Y, Sin H-S, Namkoong S-E, Um S-J. Functional inactivation of p73, a homolog of p53 tumor suppressor protein, by human papillomavirus E6 proteins. *Int J Cancer* 2001;91:822-7.

Petereit DG, Eifel PJ, Thomas GM. Cervical cancer. In: Gunderson LL, Tepper JE, editors. *Clinical radiation oncology*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000; pp.886-907.

Pinheiro MF. Aplicação do estudo do DNA na investigação biológica da filiação. *Rev Min Púb* 1996;Abr-Jun:131-7.

Pinheiro PS, Tyczynski JE, Bray F, Amado J, Matos E, Miranda AC, Limbert E. IARC, technical publication 2002;38.

Piwnica-Worms H. Fools rush in. *Nature* 1999;401:535-6.

Prokopczyk B, Cox JE, Hoffman D, Waggoner SE. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(12):868-73.

Qin J, Li L. Molecular anatomy of the DNA damage and replication checkpoints. *Radiation Res* 2003;159:139-48.

Reed J. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 1999;17(9):2941-53.

Schiffman MH, Brinton LA. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer (Suppl)* 1995;76(10):1888-901.

Schittek B, Sauer B, Garbe C. Lack of p73 mutations and late occurrence of p73 allelic deletions in melanoma tissues and cell lines. *Int J Cancer* 1999;82:583-6.

Schultheis B, Krämer A, Willer A, Hegenbart U, Goldschmidt H, Hehlmann R. Analysis of p73 and p53 gene deletions in multiple myeloma. *Leukemia* 1999;13:2099-103.

Scott M, Nakagawa M, Moscicki A-B. cell mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin Diag Lab Immunol* 2001;8(2):209-20.

Shimodaira H, Yoshioka-Yamashita A, Kolodner RD, Wang JYJ. Interaction of mismatch repair protein PMS2 and the p53-related transcription factor p73 in apoptosis response to cisplatin. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(5):2420-5.

Skegg DCG. Oral contraceptives, parity, and cervical cancer. *Lancet* 2002;359:1080-1.

Street D, Delgado G. The role of p53 and HPV in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1995;58:287-8.

Soengas MS, Lowe SW. P53 and p73: seeing double? *Nat Gen* 2000;26:391-2.

Street D, Delgado G. The role of p53 and HPV in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1995;58:287-8.

Thomas DB, Qin Q, Kuypers J, Kiviat N, Ashley RL, Koetsawang A, Ray RM, Koetsawang S. Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. II. Risk factors for in situ and invasive squamous cell cervical carcinomas. *Am J Epidemiol* 2001;153(8):732-9.

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

Tsutsumi K, Sun Q, Yasumoto S, Kikuchi K, Ohta Y, Pater A, Pater MM. *In vitro* and *in vivo* analysis of cellular origin of cervical squamous metaplasia. *Am J Pathol* 1993;143(4):150-8.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-9.

Wang XW, Zhan Q, Coursen JD, Khan MA, Kontny HU, Yu L, Hollander MC, O'Connor PM, Fornace AJ, Harris CC. GADD45 induction of a G₂/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci*; 1999;96:3706-11.

White E, Prives C. DNA damage enables p73. *Nature* 1999;399:734-5.

White PS, Maris JM, Sulman EP, Jensen SJ, Kyemba SM, Beltinger CP, Allen C, Kramer DL, Biegel JA, Brodeur GM. Molecular analysis of the region of distal 1p commonly deleted in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1997;33(12):1957-61.

Ylitalo N, Sørensen P, Josefsson A, Frisch M, Sparén P, Pontén J, Gyllensten U, Melbye M, Adami H-O. Smoking and oral contraceptives as risk factors for cervical carcinoma *in situ*. *Int J Cancer* 1999;81:357-65.

Yuan Z-M, Shioya H, Ishiko T, Sun X, Gu J, Huang YY, Lu H, Kharbanda S, Zhu J, Jiang J, Zhou W, Chen X. The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res* 1998;58:5061-5.

Zhu J, Jiang J, Zhou W, Chen X. The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res* 1998;58:5061-5.

Zimonjic DB, Simpson S, Popescu NC, Dipaolo JA. Molecular cytogenetics of human papillomavirus-negative cervical carcinoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;82:1-8.

Zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Eur J Cancer* 1999;35(8):1174-81.

Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(9):690-8.

8. ANEXO

Apresenta-se em anexo a cópia do artigo escrito com base neste trabalho e aceite para publicação na revista *Cancer Genetics and Cytogenetics* sob o título “*p73 genetic alterations in cervical carcinoma*”.

***p73* genetic alterations in cervical carcinoma**

Rogéria Craveiro^a, Sandra Costa^b, Daniela Pinto^b, Lurdes Salgado^a, Luisa Carvalho^a, Carla Castro^a, Isabel Bravo^a, Carlos Lopes^b, Isabel Silva^a, Rui Medeiros^{b*}.

^a Department of Radiotherapy, Instituto Português de Oncologia, 4200-072 Porto, Portugal

^b Molecular Oncology Unit, Instituto Português de Oncologia, 4200-072 Porto, Portugal

Abbreviated title: p73 genotypes and cervical cancer

**Correspondence should be addressed to:*

Dr. Rui Medeiros,

Laboratórios-PISO 4, Unit of Molecular Oncology,

Instituto Português de Oncologia, Porto,

R. Dr. Ant. Bernardino Almeida, 4200-072 Porto, Portugal.

Tel: 351-22 5502011,

Email: medeirosR@mail.com

Abstract

Infection with human papillomaviruses (HPV) is essential in the carcinogenesis of the uterine cervix. However, a complex interrelation between viral and cellular genes is necessary for cell-cycle control deregulation and development and progression of cervical cancer induction. *p73* gene is localized in 1p36.3 region, which is often deleted by loss of heterozygosity (LOH) in human cancers. We analyzed the *p73* CT polymorphism and LOH in this locus, by PCR-RFLP in 134 DNA samples from biopsies of 67 primary untreated invasive cervix tumors and the corresponding peripheral blood. Genotype frequencies of 56.7% for homozygous genotype GC/GC and 43.3% for heterozygous genotype GC/AT were found. The presence of GC/AT genotype in tumors was associated with lower age at menarche ($p = 0.039$) and high parity ($p = 0.015$). In 20.0% of DNA tumor samples AT allele was lost in comparison to their DNA normal blood pair. AT allele was conserved in women with high parity. This was not the case in the group with low parity, with 33.3% of patients showing loss of AT allele in tumor DNA. ($p = 0.041$). These results suggest that *p73* genetic alterations may contribute to the genesis and/or progression of cervical carcinoma on a HPV infected transformation zone under prolonged exposure to hormonal change events related to pregnancy.

1. Introduction

Cervical cancer is the most common gynecologic malignancy worldwide and one of the most common causes of death in women. In Portugal cervical cancer has an age-standardized incidence rate of 17.0 per 100000 women and is responsible for 4.2% of malignant deaths (seventh place) [1]. Cervical cancer is thought to develop through a multistep process involving virus, tumor suppressor genes and proto-oncogenes. Infection of epithelial cells with human papillomaviruses (HPV), mainly genotypes 16 and 18, is essential in the carcinogenesis of the uterine cervix. However, the infection *per se* is not sufficient to induce malignant conversion [2,3]. The fact that only a minority of HPV-infected lesions progress to invasive cancer over a long period of time suggests that additional events are necessary for malignant transformation.

The co-factors that may have a role in the development and progression of cervical cancer in HPV infected women are still controversial and subject of research. It has been proposed that early age at sexual initiation, hormonal factors such as high parity and use of oral contraceptives, cigarette smoking, sexually transmitted agents others than HPV, deficiencies in certain micronutrients, an immunocompromised state, and various measures of socioeconomic status may be relevant factors in the modulation of the oncogenic effect of HPV infection [4,5]. It has been known that high parity increases the risk of squamous-cell carcinoma of the cervix among HPV-positive women and the general decline in birth rates might therefore partly be attributable to the reduction in cervical cancer incidence recently seen in most industrialized countries [6].

A complex interrelation between viral and cellular genes is necessary for cell-cycle control deregulation, followed by progression to malignant conversion towards immortalization [3]. Integration may play a role in progression and maintenance of neoplasia and it has been demonstrated that protein products of HPV early genes (E6, E7) interact with growth-regulatory

proteins of the human cell, p53 and pRb, contributing a possible mechanism for an HPV oncogenic effect [7]. The development of cervical cancer and subsequent metastases clearly require more changes, involving the induction of chromosomal instability, namely mutations and allelic loss of heterozygosity [8,9], with the subsequent inactivation and deletion of multiple tumor suppressor genes.

Deletion or inactivation of *p53*, a critical human tumor suppressor gene, results in the loss of checkpoint integrity of the cell that proceeds unchecked through the cell cycle, towards proliferation, instead of being arrested to repair DNA damage or to undergo apoptosis [10].

p73, a gene structurally similar to *p53* that can also inhibit cell growth and induce apoptosis, is localized in 1p36.3 region [9,11], which is often deleted by loss of heterozygosity (LOH) in a wide range of human cancers, including those of the skin, colon, breast and liver, as well as neuroblastoma [12]. Data concerning allele-specific expression analysis of *p73* gene polymorphisms is heterogeneous, ranging from 5.3% (marker in intron 9) in prostatic carcinomas to 42% (marker in exon 1) in lung cancers [9]. The *p73* gene has 2 naturally occurring alleles with a polymorphism in exon 2 consisting of a double nucleotide substitution G→A and C→T at positions 4 and 14: the GC and AT alleles. The AT allele has an additional *Sty* I restriction site, which doesn't exist in GC allele [13]. The presence of this polymorphism was already reported in informative lung squamous cancers and esophageal squamous cell carcinomas [9,14].

To the best of our knowledge, no data describing *p73* C/T polymorphism genotype frequencies and LOH in this locus, in cervical carcinoma, has been reported. Therefore the purpose of this study was to analyze the C/T polymorphism in exon 2 of this gene and whether LOH at this locus may indicate a role for *p73* gene in the carcinogenesis of cervical cancer.

2. Materials and methods

Biopsies from 67 primary untreated invasive cervix tumors and the corresponding peripheral blood samples were obtained from patients of the Department of Radiotherapy, Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal, from 1997 to 2002. All samples were taken after informed consent according to the Declaration of Helsinki.

Clinical characteristics including histological type and stage of tumors (according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics – FIGO – criteria), age at diagnosis, at menarche and at menopause, number of pregnancies and of full-term pregnancies and data about the use of oral contraceptives were obtained from medical records (Table 1 and Table 2). High parity women was defined as those with three or more full-term pregnancies.

Biopsy specimens were promptly frozen at -20°C, until the time of analysis. DNA was extracted from the white blood cell fraction using a standard protocol and DNA extraction from biopsies was performed with the High Pure PCR Template Preparation Kit according to the manufacturer's instructions (Roche Molecular Biochemicals)

To evaluate the allelic expression of a C/T polymorphism in exon 2 of the *p73* gene, PCR amplification of DNA samples obtained from 67 patients, was performed using two primers (5'-CAGGAGGACAGAGCACGAG-3' and 5'-CGAAGGTGGCTGAGGCTAG-3'), according to Mai *et al* (1998) [14] with minor modification (Invitrogen).

PCR was performed under the following conditions: 95°C for 9 min for activation of Taq DNA polymerase, followed by 95°C for 40 s, 58°C for 40 s, 72°C for 40 s and 72°C for 5 min for 40 cycles. A specific 229 bp fragment was obtained and electrophoresed on an 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide.

The *p73* gene has a polymorphism in exon 2 with two naturally occurring alleles: the GC and AT alleles. The AT allele has an additional *Sty* I restriction site, which doesn't exist in GC

allele. To identify heterozygous samples to this C/T polymorphism we analyzed DNA from the 67 tumor biopsies: 15µl of the PCR product were digested overnight at 37°C, with the restriction enzyme *Sty*I. After digestion, the GC allele had one fragment of 229 bp and the AT allele had two fragments of 157 bp and 72 bp separated on a 3% agarose gel with ethidium bromide staining. Cases with 229 and 157 or 72 bp *Sty* I-digested fragments were judged to be informative, that is heterozygous, having both GC and AT alleles, while cases showing only one *Sty* I-digested fragment were regarded as homozygous. We didn't find any case with a homozygous genotype for AT allele.

Statistical analysis of data was performed using the computer software SPSS for Windows (Version 7.5). Chi square analysis was used to compare categorical variables. The significance level was defined as $p < 0.05$.

3. Results

The distribution of tumor stages was: 17.9% (12) stage I, 62.7% (42) stage II, 19.4% (13) stage III. Of all tumors, 80.6% (54) were diagnosed as squamous cell carcinoma (SCC), 11.9% as adenocarcinomas (7) or adenosquamous carcinomas (1) and the remaining 7.5% included other histologies (5). The medical records from all 67 patients were examined to assess the status of disease at the closing date of the study. The median follow-up of patients was 36.0 months (1-64) with a mean of months of 30.60 (SD = 20.15).

It was not possible to obtain the data concerning to age at menarche (2), at first sexual intercourse (9) and at menopause (2) as well as to the use of oral contraceptives (5) in some cases. The median age at diagnosis was 47.0 (24-73) years with a mean age of 49.8 (SD = 11.8) years. The median age at menarche was 13.0 years with a mean of 13.1 (SD = 2.2) years and at

first sexual intercourse was 20.0 years with a mean of 21.1 (SD = 5.5) years. In 23 women the median age at menopause was 50.0 years with a mean of 46.5 (SD = 11.2) years.

In 67 pairs of tumor samples/peripheral blood, the presence of the C/T polymorphism of exon 2 in *p73* gene was detected in tumor DNA samples. The frequencies of genotypes were: 56.7% (38 out of 67) for homozygous genotype GC/GC and 43.3% (29 out of 67) for heterozygous genotype GC/AT.

In Table 1, we present the results regarding the associations of the presence of genotypes GC/GC and GC/AT in tumors and mean age at diagnosis (49.3 ± 12.5 years vs. 50.4 ± 11.0 years), at menarche (13.6 ± 2.2 years vs. 12.5 ± 2.1 years), at first sexual intercourse (20.6 ± 5.4 years vs. 21.9 ± 5.7 years) and at menopause (48.2 ± 5.3 years vs. 44.3 ± 16.1 years). When analyzing these differences, we found a significant association between the presence of GC/AT genotype in tumors and a lower age at menarche ($p = 0.039$), but not with age at diagnosis ($p = 0.715$), at first sexual intercourse ($p = 0.397$) or at menopause ($p = 0.426$).

We found GC/AT genotype predominantly present in women (Table 2) with high parity (60.7% vs. 39.3% to GC/GC genotype), comparing with those with low parity among whom the GC/GC genotype was more frequent (69.2% vs. 30.8% to GC/AT genotype; $p = 0.015$). Regarding the number of pregnancies, these differences on the incidence of genotypes GC/GC and GC/AT were not significant (48.6% vs. 51.4% in women with three or more pregnancies and 66.7% vs. 33.3% in women with less than three pregnancies; $p = 0.139$). Genotypes GC/GC and GC/AT were respectively present in 53.7% and 46.3% of SCC, 62.5% and 37.5% of adenocarcinomas or adenosquamous carcinomas and 80.0% and 20.0% of the other histologies. These differences were not significant ($p = 0.493$). There was no significant association between tumor stage and the presence of GC/GC genotype and GC/AT genotype ($p = 0.529$): 50.0% and 50.0% for stage I; 61.9% and 38.1% for stage II; 46.1% and 53.8% for stage III. We have not found significant association ($p = 0.894$) between the incidence of GC/GC genotype and of

GC/AT genotype and the use of oral contraceptives: 53.8% and 46.2% in women that had used oral contraceptives vs. 55.6 % and 44.4% in the group that never had used oral contraceptives, respectively.

To identify heterozygous samples to this C/T polymorphism we compared the 67 tumor biopsies with their peripheral blood pairs. When analyzing normal DNA from patient blood samples we found 28 heterozygous cases that are informative for LOH analysis. We could find a conclusive result in only 25 cases. The distribution of tumor stages was: 20.0% (5) stage I, 60.0% (15) stage II, 20.0% (5) stage III. Of all tumors, 68.0% (17) were diagnosed as squamous cell carcinoma (SCC), 20.0% as adenocarcinomas (5) and the remaining 12.0% (3) included other histologies.

The median age at diagnosis was 49.0 years with a mean age of 48.9 (SD = 10.3) years. The median age at menarche was 12.5 years with a mean of 12.9 (SD = 2.0) years and at first sexual intercourse was 20.5 years with a mean of 20.4 (SD = 2.1) years. The median age at menopause was 49.5 years with a mean of 48.5 (SD = 6.5) years (Table 3).

We observed that 20.0% (5/25) of tumor DNA biopsies revealed LOH, with the loss of AT allele, comparing with DNA of their peripheral blood sample pairs. In Table 3, we present the results regarding the associations of the presence and loss of AT allele in tumors and mean age at diagnosis (49.6 ± 11.2 years vs. 46.2 ± 5.0 years), at menarche (12.7 ± 2.1 years vs. 13.4 ± 1.7 years), at first sexual intercourse (20.6 ± 2.1 years vs. 19.8 ± 1.3 years) and at menopause (47.7 ± 6.8 years vs. 52.0 years in only one patient). When analyzing these differences, we didn't find any significant association. Concerning the other studied parameters like tumor and histology stage, number of pregnancies and high parity (Table 4), we found that women with high parity maintained AT allele, comparing with those with low parity among whom 33.3% patients lost AT allele in tumor ($p = 0.041$). When we regarded the number of pregnancies, these differences on the incidence of presence and loss of AT allele were not significant (85.7% for

presence of AT allele vs. 14.3% for AT allele loss in women with three or more pregnancies and 72.7% for presence of AT allele vs. 27.3% for AT allele loss in women with less than three pregnancies; $p = 0.420$). Frequencies of tumors with the presence or loss of AT allele by histology type were respectively: 88.2% and 11.8% of SCC, 80.0% and 20.0% of adenocarcinomas and 33.3% and 66.7% of the other histologies, respectively. These differences were not significant ($p = 0.091$). There was no significant association between tumor stage and the presence or loss of AT allele ($p = 0.287$).

4. Discussion

The mechanism of cervical cancer carcinogenesis is not well understood. Our study is the first report suggesting a role for *p73* polymorphisms in cervical cancer.

p73, unlike *p53*, is functionally inactivated by both high- and low-risk HPV E6s, by a different mechanism that doesn't involve degradation through a ubiquitin pathway, which could play an important role in the malignant transformation and benign condyloma formation of the cervix, respectively [15]. E6 binds to *p73*, inhibiting the *p73*-mediated activation of *p21^{WAF1}* (*CDKN1A*), a *p53* target primarily responsible for *p53*-dependent G1 arrest, and hence providing an advantage for cervix carcinogenesis [15].

p73 is activated by E2F-1 to induce apoptosis in the absence of *p53* and of *pRb* and high levels of *p73* protein levels are observed [17]. Consistent with this *E2F1*-dependent activation pathway of expression is the strong association between deregulated expression of *14ARF* and *p73* in cervical intraepithelial neoplasias (CIN) III and squamous cell carcinomas [16].

p73 is involved in response to chemotherapeutic agents-, such as cisplatin [18], and γ irradiation-induced DNA-damage, by a *p53*-independent mechanism [19,20], resulting in apoptotic cell death [21] and in G2M arrest [22,23,24].

1p36.3 region, where *p73* gene is localized, is often deleted by LOH in various human tumors, including neuroblastoma, pheochromocytoma, oligodendroglioma, melanoma, Merkel cell cancer, germ cell cancer, breast cancer, ovarian cancer, liver cancer and colon cancer as well as in some precancerous lesions like colorectal adenomas [25]. In cervix carcinoma immunocytochemical data showed that p73 expression was widespread throughout neoplastic lesions, increasing its expression with grade of neoplasia and being maximal in squamous cell carcinomas, but confined to basal and supra-basal layers in normal cervical epithelium [16].

We analyzed a C/T polymorphism of exon 2 in the *p73* gene in cervix carcinoma where no data was reported. Alterations of this polymorphism, namely allelic loss by LOH, could be responsible for differences in p73 expression of tumours vs normal tissue. Our results show a significant association between the presence of heterozygous genotype GC/AT in tumors and a lower age at menarche ($p = 0.039$) and with high parity ($p = 0.015$). We observed the allelic loss of C/T polymorphism locus of *p73* gene in 20.0% of the informative cases of the cervix cancer biopsies. In patients with high parity AT allele was conserved which was not the case in the group with low parity, with 33.3% of patients showing loss of AT allele in tumor DNA ($p = 0.041$).

High parity has been known to be associated with cervix cancer since 1931 [26] even after taking HPV infection into account. In fact nulliparous women are at lower risk of squamous-cell carcinoma of the cervix than parous ones, and among these, the risk increases with number of full-term pregnancies [6]. Moreover the declining of multiparity in most developed and developing countries over past decades could be in part responsible for the decrease in cervical cancer incidence and mortality [6,26]. An association with full-term pregnancies, but not with abortions, suggests that events related to the second and third trimesters of pregnancy or to delivery might be relevant [6,27]. Concentrations of estrogens and progesterone in blood increase progressively during pregnancy reaching the maximum in the

final weeks [6]. These hormonal changes are probably responsible for cervical ectopy, in the transformation zone [6,26].

Cervical ectopy is higher in parous women, starting early during pregnancy and being more pronounced during the second and third trimesters, and increases with the number of full-term pregnancies, by a factor of 3.3 in women having given birth to five children or more [26]. Squamous metaplasia of the transformation zone occurs during development and sexual maturation apparently by an adaptative response [28] and also increases during pregnancy to reach a maximum during the third trimester [6]. High parity maintains the transformation zone on the ectocervix for many years, thus facilitating the direct exposure to HPV and other cofactors [6]. Consistent with this, more than 90% of HPV-induced lesions and cervical cancers, approximately 80% of these are squamous cell carcinomas [7], originate in the transformation zone, the most estrogen-sensitive genital site [26,29].

The hormone estrogen, has been implicated in carcinogenesis and was finally declared a human carcinogen by the National Toxicology Program of USA in the end of the year 2002 [30]. Estrogens can promote cancer by signaling proliferation in cells with genetic mutations that could become malignant by multiplying without control [30]. Moreover normal mammalian cells can become cancer cells because they suffer mutations when metabolizing estrogens. This happens through hydroxylation of estrogen and subsequent methylation to form catechol and methoxylated estrogens. Catechol estrogens, among which 4-hydroxyestrone and 16 α -hydroxyestradiol are considered carcinogenic, are capable of continuous metabolic redox cycling yielding quinone intermediates as metabolites. The genotoxic activity of estrogens is due to the covalent binding of these intermediates to DNA, pulling out a nucleotide base – depurination – with the subsequent formation of highly mutagenic apurinic sites [30,31,32]. In this process the catechol estrogen metabolites may also generate free radicals that damage DNA contributing substantially to estrogen's potency as a cancer initiator. Estrogen related cancers occur in those

tissues that produce the enzymes responsible for turning estradiol into the first metabolite of catechol estrogens [30].

The demonstration of an increase in 16 α -hydroxylation of estradiol to 16 α -hydroxyestrone, that covalently binds to the estrogen receptor in the estrogen highly sensitive transformation zone of cervix, in the presence of high-risk HPV infection, suggested the synergistic activation of proliferation by viral oncoprotein cell cycle deregulation and estrogen receptor signaling prolonging the effect of estrogen [3,28,29].

Like 16 α -hydroxyestrone, estrogen and progesterone increase E2- and E7-induced p53-dependent apoptosis by respectively interacting with p53 and RB-E2F complex. This effect doesn't occur in the presence of E6 protein, which can bind to p53, promoting its degradation by ubiquitin [3], and to p73 inactivating its transactivation function, independent of its DNA binding activity [15]. Furthermore, the inactivation mechanism of p73 by E6 appear to be analogous to that of p53 by HTLV Tax protein in that both viral proteins interact with amino-terminal transactivation domains of p73 and p53 without modulating their DNA binding activities. We may hypothesize that p73 polymorphism (which is localized in exon 2 within TAD) lead to alterations in the affinity of E6 protein to p73, in a similar way of what happens with p53 polymorphism at codon 72 of exon 4.

Another line of evidence suggests that the interaction between p53 and p73 is enhanced by the Arg amino acid in the codon 72 polymorphism of p53 [33]. This may neutralize p73-induced apoptosis. Therefore, we may suggest that p73 polymorphisms may influence this interaction as well as the p73 function on regulation of nuclear entry and binding of estrogens to estrogen receptors already found in goat uterine [34].

When interacting with other genes, the existence of haploinsufficiency of p73, consequent to deletion, together with the possible inactivation of the remaining allele, may lead to dysfunctional complexes or loss of function that could contribute to tumor development [35].

Our results highlight the need for future enlargement of the study with more cases and its extension to normal control cases to find if AT allele is over represented in cervical tumors and to clarify a possible association of LOH of *p73* with the different histological types. Further research may consider experiments that explore functional effects of introduction of the GC/AT polymorphism in cervical epithelial cells.

Taking altogether, all these data are consistent with our results suggesting a role for *p73* in cervix carcinoma. We hypothesize that the occurrence of alterations in *p73* gene, namely polymorphisms, could be involved in the genesis and/or progression of cervical carcinoma, particularly in the transformation zone of HPV infected women with higher lifelong exposure to estrogen, resulting from early menarche and multiparity.

Acknowledgements

This work was supported by the Portuguese Ministry of Health - Project N° 214/2001 (Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde).

References

- [1] Pinheiro PS, Tyczynski JE, Bray F, Amado J, Matos E, Miranda AC, Limbert E. IARC, technical publication 2002;38.
- [2] Zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Eur J Cancer* 1999;35(8):1174-81.
- [3] De Villiers E-M. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Int J Cancer* 2003;103:705-8.
- [4] Bayo S, Bosch FX, De Sanjosé S, Muñoz N, Combita AL, Coursaget P, Diaz M, Dolo A, Van den Brule AJC, Meijer CJM. Risk factors of invasive cervical cancer in Mali. *Int J Epidemiol* 2002;31:202-9.
- [5] Thomas DB, Qin Q, Kuypers J, Kiviat N, Ashley RL, Koetsawang A, Ray RM, Koetsawang S. Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. II. Risk factors for in situ and invasive squamous cell cervical carcinomas. *Am J Epidemiol* 2001;153(8):732-9.
- [6] Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJLM, Bosch FX. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002;359:1093-101.
- [7] Schiffman MH, Brinton LA. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer (Suppl)* 1995;76(10):1888-901.
- [8] Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(9):690-8.
- [9] Cai YC, Yang G-y, Nie Y, Wang L-D, Zhao X, Song Y-l, Seril DN, Liao J, Xing EP, Yang CS. Molecular alterations of *p73* in human esophageal squamous cell carcinomas: loss of heterozygosity occurs frequently; loss of imprinting and elevation of *p73* expression may be related to defective p53. *Carcinogenesis* 2000;21(4):683-9.

- [10] Street D, Delgado G. The role of p53 and HPV in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1995;58:287-8.
- [11] White E, Prives C. DNA damage enables p73. *Nature* 1999;399:734-5.
- [12] Han S, Semba S, Abe T, Makino N, Furukawa T, Fukushige S, Takahashi H, Sakurada A, Sato M, Shiiba K, Matsuno S, Nimura Y, Nakagawara A, Horii A. Infrequent somatic mutations of the *p73* gene in various human cancers. *Eur J Surg Oncol* 1999;25:194-8.
- [13] Schitteck B, Sauer B, Garbe C. Lack of p73 mutations and late occurrence of p73 allelic deletions in melanoma tissues and cell lines. *Int J Cancer* 1999;82:583-6.
- [14] Mai M, Yokomizo A, Qian C, Yang P, Tindall DJ, Smith DI, Liu W. Activation of p73 silent allele in lung cancer. *Cancer Res* 1998;58:2347-9.
- [15] Park J-S, Kim E-J, Lee J-Y, Sin H-S, Namkoong S-E, Um S-J. Functional inactivation of p73, a homolog of p53 tumor suppressor protein, by human papillomavirus E6 proteins. *Int J Cancer* 2001;91:822-7.
- [16] Brooks LA, Sullivan A, O'Nions J, Bell A, Dunne B, Tidy JA, Evans DJ, Osin P, Vousden KH, Gusterson B, Farrell PJ, Storey A, Gasco M, Sakai T, Crook T. E7 proteins from oncogenic human papillomavirus types transactivate p73: role in cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2002;86:263-8.
- [17] Irwin M, Marin MC, Phillips AC, Seelan RS, Smith DI, Liu W, Flores ER, Tsai KY, Jacks T, Vousden KH, Kaelin WG. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 2000;407:645-8.
- [18] Gong JG, Costanzo A, Yang H-Q, Melinos G, Kaelin WG, Levrero M, Wang JYJ. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 1999;399:806-9.
- [19] Agami R, Blandino G, Oren M, Shaul Y. Interaction of c-Abl and p73 α and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* 1999;399:809-13.

- [20] Yuan Z-M, Shioya H, Ishiko T, Sun X, Gu J, Huang YY, Lu H, Kharbanda S, Weichselbaum R, Kufe D. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* 1999;399:814-7.
- [21] Hamer G, Gademan IS, Kal HB, De Rooij DG. Role for c-Abl and p73 in the radiation response of male germ cells. *Oncogene* 2001;20:4298-304.
- [22] Zhu J, Jiang J, Zhou W, Chen X. The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res* 1998;58:5061-5.
- [23] Qin J, Li L. Molecular anatomy of the DNA damage and replication checkpoints. *Radiation Res* 2003;159:139-48.
- [24] Fei P, Bernhard EJ, El-Deiry WS. Tissue-specific induction of p53 targets *in vivo*. *Cancer Res* 2002;62:7316-27.
- [25] Schultheis B, Krämer A, Willer A, Hegenbart U, Goldschmidt H, Hehlmann R. Analysis of p73 and p53 gene deletions in multiple myeloma. *Leukemia* 1999;13:2099-103.
- [26] Autier P, Coibion M, Huet F, Grivegne AR. Transformation zone location and intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Br J Cancer* 1996;74:488-90.
- [27] Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, Herrero R, De Britton RC, Gaitan E, Tenorio F, Garcia M, Rawls WE. Parity as a risk factor for cervical cancer. *Am J Epidemiol* 1989;130(3):486-96.
- [28] Elson DA, Riley RR, Lacey A, Thordarson G, Talamantes FJ, Arbeit JM. Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. *Cancer Res* 2000;60:1267-1275.
- [29] Jin L, Qi M, Chen D-Z, Anderson A, Yang G-Y, Arbeit JM, Auborn KJ. Indole-3-carbinol prevents cervical cancer in human papilloma virus type 16 (HPV16) transgenic mice. *Cancer Res* 1999;59:3991-7.

- [30] Miller K. Estrogen and DNA damage: the silent source of breast cancer? *J Natl Cancer Inst* 2003;95(2):100-2.
- [31] Cavalieri E, Frenkel K, Liehr JG, Rogan E, Roy D. Chapter 4: estrogens as endogeneous genotoxic agents – DNA adducts and mutations. *J Natl Cancer Inst: Monographs* 2000;27:75-93.
- [32] Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *New Eng J Med* 2002;346(5):340-52.
- [33] Marin MC, Jost CA, Brooks LA, Irwin MS, O’Nions J, Tidy JA, James N, McGregor JM, Harwood CA, Yulug IG, Vousden KH, Allday MJ, Gusterson B, Ikawa S, Hinds PW, Crook T, Kaelin WG. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet* 2000;25(1):47-54.
- [34] Padma S, Renil M, Varman Thampan R. Protein-protein interactions that precede the nuclear entry of goat uterine estrogen receptor under cell-free conditions. *J Cell Biochem* 2000;78(4):650-65.
- [35] Soengas MS, Lowe SW. p53 and p73: seeing double? *Nat Genet* 2000;26:391-2.

Table 1

Association of C/T polymorphism with age of patients.

Age (years)	Total		GC/GC	GC/AT	p value ^a
	Median	Mean \pm SD	Genotype Mean \pm SD	Genotype Mean \pm SD	
Age at diagnosis	47.0	49.8 \pm 11.8	49.3 \pm 12.5	50.4 \pm 11.0	0.715
Age at menarche	13.0	13.1 \pm 2.2	13.6 \pm 2.2	12.5 \pm 2.1	0.039
Age at first sexual intercourse	20.0	21.1 \pm 5.5	20.6 \pm 5.4	21.9 \pm 5.7	0.397
Age at menopause	50.0	46.5 \pm 11.2	48.2 \pm 5.3	44.3 \pm 16.1	0.426

^aT Student test

Table 2

Association between C/T polymorphism and five clinical-pathological characteristics of patients with cervix cancer.

Patient characteristics		GC/GC Genotype		GC/AT Genotype		p value ^a
		N ^o	(%)	N ^o	(%)	
Oral contraceptives	yes	14	53.8	12	46.2	0.894
	no	20	55.6	16	44.4	
N ^o of pregnancies	< 3	20	66.7	10	33.3	0.139
	≥ 3	18	48.6	19	51.4	
Parity*	< 3	27	69.2	12	30.8	0.015
	≥ 3	11	39.3	17	60.7	
Tumor stage	I	6	50.0	6	50.0	0.529
	II	26	61.9	16	38.1	
	III	6	46.1	7	53.8	
Tumor histology type	SCC	29	53.7	25	46.3	0.493
	Adeno	5	62.5	3	37.5	
	Others	4	80.0	1	20.0	

SCC – squamous cell carcinoma; Adeno – adenocarcinoma plus adenosquamouscarcinoma

^aQui-square test

*N^o of full-term pregnancies

Table 3

Association between presence or loss of AT allele at *p73* locus with age of patients.

Age (years)	Total		AT allele Presence	AT allele Loss	p value ^a
	Median	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
	Age at diagnosis	49.0	48.9 \pm 9.9	49.6 \pm 11.2	
Age at menarche	12.5	12.9 \pm 2.0	12.7 \pm 2.1	13.4 \pm 1.7	0.527
Age at first sexual intercourse	20.5	20.4 \pm 2.1	20.6 \pm 2.1	19.8 \pm 1.3	0.444
Age at menopause	49.5.0	48.5 \pm 6.5	47.7 \pm 6.8	52.0	0.576

^aT Student test

Table 4

Association between the presence or loss of AT allele at *p73* locus with four clinical-pathological characteristics among patients with cervical cancer.

Patient characteristics		AT allele presence		AT allele loss		p value ^a
		N°	(%)	N°	(%)	
N° of pregnancies	< 3	8	72.7	3	27.3	0.420
	≥ 3	12	85.7	2	14.3	
Parity*	< 3	10	66.7	5	33.3	0.041
	≥ 3	10	100.0	0	0.0	
Tumor stage	I	3	60.0	2	40.0	0.287
	II	12	80.0	3	20.0	
	III	5	100.0	0	0.0	
Tumor histology type	SCC	15	88.2	2	11.8	0.091
	Adeno	4	80.0	1	20.0	
	Others	1	33.3	2	66.7	

SCC – squamous cell carcinoma; Adeno – adenocarcinoma plus adenosquamous carcinoma

*N° of full-term pregnancies

^aChi-square test