



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA**



MARIA CLARA BATISTA COSTA FERREIRA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO NO CÓDON 72 DO GENE *TP53*,
INFECÇÃO POR HPV E LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS E
NEOPLÁSICAS NA CÉRVIX UTERINA**

Ouro Preto
2017

MARIA CLARA BATISTA COSTA FERREIRA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO NO CÓDON 72 DO GENE *TP53*,
INFECÇÃO POR HPV E LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS E
NEOPLÁSICAS NA CÉRVIX UTERINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola de Farmácia da Universidade Federal
de Ouro Preto como parte dos requisitos para a
obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Angélica Alves Lima

Co-orientadora: Msc. Nayara Nascimento Toledo Silva

Ouro Preto
2017

F368a Ferreira, Maria Clara Batista Costa .
Análise do polimorfismo no códon 72 do gene TP53, infecção por HPV e
lesões pré-neoplásicas e neoplásicas na cérvix uterina [manuscrito] /
Maria Clara Batista Costa Ferreira. - 2017.

49f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Angélica Alves Lima.
Coorientador: MSc. Nayara Nascimento Toledo Silva.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de
Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. HPV. 2. Virus do papiloma. 3. Câncer. I. Lima, Angélica Alves. II. Silva,
Nayara Nascimento Toledo. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV.
Título.

CDU- 616-006 52

Catálogo: ficha@sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

TERMO DE APROVAÇÃO

ANÁLISE DO POLIMORFISMO NO CÓDON 72 DO GENE TP53, INFECÇÃO POR HPV E LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS NA CÉRVIX UTERINA

Trabalho de conclusão de Curso defendido por **MARIA CLARA BATISTA COSTA FERREIRA**, matrícula 12.1.2168 em 21 de agosto de 2017, e aprovado pela comissão examinadora:

Prof. Dra. Angélica Alves Lima
DEACL-EF-UFOP, orientadora

MSc. Tamires Cunha Almeida
CIPHARMA-UFOP

Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira
DEACL-EF-UFOP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me sustentado e conduzido até aqui com Seu amor incondicional.

Agradeço à minha Mamãe por todo amor, amizade e por estar sempre ao meu lado. Ao meu pai por todo apoio e dedicação. Ao meu irmão João Pedro por ter me incentivar a “ir além”. Muito obrigada, esta conquista é nossa!

Ao meu avô Persival pelos valores a mim passados. Ao Tio Persi, à Tia Cristine e aos meus primos pelo carinho e apoio.

À minha orientadora professora Dr^a. Angélica Alves Lima e à minha co-orientadora Mestre Nayara Toledo pela oportunidade, paciência e por tanto aprendizado.

Aos irmãos da Igreja Cristã Maranata por toda assistência e orações.

Aos meus amigos e colegas de Ouro Preto que tornaram esta trajetória mais leve, aos amigos de Lafaiete e ao “CFFAFi” que sempre me apoiaram.

Aos Mestres da gloriosa Escola de Farmácia pelos ensinamentos e ao grupo ÂMBAR.

Ao CNPq e à UFOP pelo financiamento e apoio.

*Posso todas as coisas naquele que me fortalece.
Filipenses 4:13*

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre o polimorfismo no códon 72 do gene *TP53*, a infecção por HPV e o risco de desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da cérvix uterina. Foram selecionadas 228 amostras de biópsias cervicais, divididas em grupo Controle (n=114), constituído de amostras apresentando cervicite, e grupo de Casos (n=114), composto por amostras apresentando Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau I (NIC I) (n=28), NIC II (n=28), NIC III (n=29) e Carcinoma Epidermoide Invasor (n=29). Para a pesquisa do HPV utilizou-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o conjunto de iniciadores SPF. A análise do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* também foi realizada por PCR utilizando iniciadores específicos para cada alelo. Os resultados mostraram que 45,6% das amostras (n=104) apresentaram genótipo não polimórfico (RR), 39,5% (n=90) eram heterozigotas (RP) e 14,9% (n=34) polimórficas (PP). Infecção pelo HPV foi encontrada em 95,6% das amostras (n=218). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências genotípicas ou alélicas do gene *TP53* e a presença da infecção viral (genótipo: p=0,776; alelo: p=0,968). Por outro lado, foi observado risco duas vezes maior de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas na cérvix uterina entre indivíduos RR se comparado aos genótipos RP+PP [OR (IC95%): 2,199 (1,293-3,743); p=0,004]. Assim, pode-se concluir que o genótipo não polimórfico (RR) do códon 72 no gene *TP53* parece agir como um fator de risco para lesões no colo uterino.

Palavras chave: HPV, p53, polimorfismo R72P no gene *TP53*, neoplasia intraepitelial cervical, carcinoma epidermoide invasor.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the association between polymorphism in the codon 72 of TP53 gene, HPV infection, and the risk of development of pre-neoplastic and neoplastic lesions of the uterine cervix. A total of 228 cervical biopsy specimens, divided into a control group (n = 114), consisting of cervicite samples and a group of cases (n = 114) were selected. There groups included cervical intraepithelial neoplasia (NIC I) = 28), NIC II (n = 28), CIN III (n = 29) and Invasive Cervical Carcinoma (n = 29). For HPV detection, Polymerase Chain Reaction (PCR) technique was used with the SPF primer set. Polymorphism analysis at codon 72 of TP53 gene was also performed by PCR using primers specific for each allele. The results showed that 45.6% (n = 104) of the samples presented non-polymorphic genotype (RR), 39.5% (n = 90) were heterozygous (PR) and 14.9% (n = 34) polymorphic). HPV infection was found in 95.6% of the samples (n = 218). There was no statistically significant difference between the genotypic or allelic frequencies of TP53 gene and the presence of viral infection (genotype: $p = 0.766$, allele: $p = 0.968$). On the other hand, a two-fold higher risk of pre-neoplastic and neoplastic lesions in the uterine cervix was observed among RR individuals if compared to RP + PP genotypes [OR (95% CI): 2.199 (1.293-3.743); $p = 0.004$]. Thus, it can be concluded that the non-polymorphic genotype (RR) of codon 72 in TP53 gene appears to act as a risk factor for cervical lesions and cancer.

Key words: HPV, p53, R72P polymorphism in *TP53* gene, cervical intraepithelial neoplasia, invasive cervical carcinoma.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: A) Genoma do HPV; B) Progressão viral no tecido epitelial escamoso e a expressão das proteínas iniciais e tardias do HPV.....	14
FIGURA 2: Carcinogênese cervical. A) História natural da infecção viral; B) Alterações celulares que ocorrem paralelamente à infecção pelo HPV	16
FIGURA 3: Interações entre E6/HPV e os genótipos de p53	19
FIGURA 4: Definição da amostragem.....	20
FIGURA 5: Determinação da temperatura de anelamento para amplificação por PCR na avaliação do polimorfismo R72P do gene <i>TP53</i>	24
FIGURA 6: Avaliação da quantidade inicial de DNA de amostras parafinadas para avaliação do polimorfismo R72P do gene <i>TP53</i> por PCR.....	25
FIGURA 7: Gel de agarose representativo da análise do polimorfismo R72P do gene <i>TP53</i> por PCR alelo específica	26
FIGURA 8: Frequência genotípica (A) e alélica (B) do polimorfismo R72P no gene <i>TP53</i> ..	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para detecção do HPV desenhado por Kleter e colaboradores e para a genotipagem de <i>TP53</i>	22
TABELA 2: Associação entre o polimorfismo R72P no gene <i>TP53</i> e a infecção por HPV...	27
TABELA 3: Frequências genóticas e alélicas do gene <i>TP53</i> em relação às lesões no colo uterino e o risco de desenvolvimento de lesão cervical	28
TABELA 4: Risco de desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas na cérvix uterina de acordo com o polimorfismo R72P no gene <i>TP53</i>	28
TABELA 5: Associação entre o genótipo da proteína p53 e a gravidade da lesão cervical ...	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arg: Arginina

C: Citosina

CAAE: Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CC: Câncer Cervical

CEP: Comitê de Ética e Pesquisa

COX I: Ciclo-oxigenase I

E: Genes não estruturais do HPV

E6-AP: Proteína associada a E6

FFPE: Amostras fixadas por formol e incluídas em parafina

G: Guanina

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HPV: Papilomavírus Humano

HPV-AR: Papilomavírus Humano de Alto Risco oncogênico

HSV: Vírus da Herpes Simples

HWE: Equilíbrio de Hardy-Weinberg

IARC: Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

INCA: Instituto Nacional do Câncer

JEC: Junção Escamo Colunar

L: Genes da fase tardia do HPV

LCR: Região de controle

LT: Laboratório Tafuri

M: Marcador de peso molecular

MHC I: Complexo Principal de Histocompatibilidade I

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical

OR: *Odds Ratio*

ORF: Faixa de Leitura no DNA

pb: Pares de base

PCR: Reação da Cadeia da Polimerase

pRb: Proteína do Retinoblastoma

Pro: Prolina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	111
2. OBJETIVOS	12
2.1. GERAL.....	122
2.2. ESPECÍFICOS	12
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
3.1. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E CARCINOGENESE CERVICAL.....	13
3.2. COFATORES ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES CERVICAIS	17
3.3. POLIMORFISMO NO CÓDON 72 DO GENE <i>TP53</i>	17
4. METODOLOGIA	20
4.1. POPULAÇÃO DO ESTUDO	20
4.2. SELEÇÃO DAS AMOSTRAS	20
4.3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	21
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
5. RESULTADOS	244
5.1. ADAPTAÇÃO DA TÉCNICA PARA ANÁLISE DO POLIMORFISMO R72P NO GENE <i>TP53</i> POR PCR.....	24
5.2. FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO NO CÓDON 72 NO GENE <i>TP53</i>	26
5.3. ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO NO CÓDON 72 NO GENE <i>TP53</i> , INFECÇÃO POR HPV E LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS DA CÉRVIX UTERINA	27
6. DISCUSSÃO	30
6.1. FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO NO CÓDON 72 NO GENE <i>TP53</i> EM AMOSTRAS CERVICAIS	Erro! Indicador não definido.30
6.2. POLIMORFISMO NO CÓDON 72 NO GENE <i>TP53</i> E LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS DA CÉRVIX UTERINA.....	30
7. CONCLUSÃO.....	353
8. REFERÊNCIAS.....	364
9. ANEXOS	40

1. INTRODUÇÃO

O câncer cervical é o quarto tipo de neoplasia mais prevalente na população feminina mundial e o terceiro mais comum em mulheres brasileiras (INCA, 2016). Esta neoplasia é resultado de um processo contínuo que se inicia com a infecção do epitélio cervical normal pelo Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco oncogênico. Após a persistência da infecção, lesões intraepiteliais cervicais de baixo grau podem surgir e evoluir para alto grau, carcinoma *in situ* e, finalmente, carcinoma invasivo. Entretanto, mais de 60% das lesões intraepiteliais pré-invasivas causadas pelo vírus apresentam regressão espontânea e apenas cerca de 1% evoluem para o câncer (Steenbergen et al., 2014). Desta forma, apesar da infecção persistente pelo HPV de alto risco oncogênico ser considerada um passo importante na carcinogênese cervical, também é necessária a presença de cofatores ambientais, epigenéticos e/ou genéticos para o desenvolvimento e progressão da neoplasia intraepitelial cervical ao câncer (Sousa et al., 2011). Estes fatores podem influenciar a persistência da infecção viral, o surgimento de lesões pré-neoplásicas e a regressão ou progressão das mesmas ao câncer (Schiffman e Wentzensen, 2013).

Alguns polimorfismos genéticos vêm sendo associados ao câncer cervical. O gene *TP53*, responsável por codificar a proteína p53, possui vários polimorfismos, como o P74S, que consiste na troca do aminoácido Prolina por Serina no códon 74, e o polimorfismo V217M, que ocorre no domínio de ligação de DNA e consiste na troca de Valina por Metionina, ambos alterando a função de p53 (Whibley et al., 2009). Além destes, destaca-se o polimorfismo R72P, que acarreta na troca de Arginina (R) por Prolina (P) no códon 72 no gene *TP53*, e que se associa de maneira especial à carcinogênese cervical, uma vez que p53 polimórfica interage mais fracamente com a oncoproteína E6 do HPV, sendo menos degradada (Storey et al., 1998).

Neste sentido, diversos estudos avaliaram associações entre o polimorfismo R72P do gene *TP53* e o risco de câncer, mas os resultados são controversos e inconclusivos, além de variarem de acordo com a etnia e região geográfica (Sousa et al., 2011; Burrioni et al., 2013). Assim, mais estudos precisam ser realizados, visando a melhor compreensão do papel deste polimorfismo na infecção pelo HPV e na carcinogênese cervical.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Avaliar o polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* correlacionando-o à infecção pelo HPV e com a presença de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas na cérvix uterina

2.2. ESPECÍFICOS

Adaptar a técnica para análise do polimorfismo no códon 72 no gene *TP53* em amostras parafinadas.

Avaliar as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo no códon 72 no gene *TP53* em mulheres do estado de Minas Gerais.

3. REVISÃO DA LITERATURA

O câncer cervical ou do colo uterino (CC) é o quarto tipo de neoplasia mais comum na população feminina mundial, com 528 mil novos casos e 266 mil mortes a cada ano, o que corresponde a 7,5% dos óbitos por câncer em mulheres (IARC, 2012). No Brasil, foi estimado o surgimento de 16.340 novos casos para o ano de 2016. A região sudeste é a segunda no país com maior incidência: 9,63/100 mil novos casos (INCA, 2016).

Está bem estabelecido que a infecção persistente pelo HPV de alto risco oncogênico (HPV-AR) é requerida para o desenvolvimento do câncer cervical, sendo o vírus detectado em 99,7% dos casos desta neoplasia (Zur Hausen, 2002).

3.1. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E CARCINOGENESE CERVICAL

O HPV é um vírus não envelopado com aproximadamente 55 nm de diâmetro. Seu genoma, uma molécula com DNA circular de fita dupla com aproximadamente 8000 pares de base, é dividido em uma região de controle (*Long Control Region* - LCR) e oito faixas de leitura (*Open Reading Frame* - ORF) – E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 e L2 (Figura 1A). Os genes não estruturais E (“*early*”) são expressos no início da infecção, enquanto os genes L (“*late*”) são expressos durante a fase tardia, sendo ambos responsáveis por codificar as proteínas que compõem o capsídeo viral (Figura 1B) (Zur Hausen, 2002).

A expressão dos genes não estruturais atrasa a diferenciação celular e promove a replicação das células infectadas, permitindo a amplificação do material genético do vírus (Zur Hausen, 2002).

Através de uma microabrasão, o HPV infecta a camada basal do epitélio, preferencialmente a Junção Escamo Colunar (JEC), e se reproduz no epitélio escamoso estratificado, utilizando a diferenciação deste tecido para regular a sua replicação (Figura 1B). Por isso, o vírus requer a disponibilidade de epiderme ou de células epiteliais da mucosa que ainda são capazes de proliferar (Doorbar, 2006).

Após a infecção pelo HPV, nas células jovens do epitélio basal, acontece a expressão das proteínas não estruturais (Figura 1B). Fisiologicamente, as células se expandem verticalmente e o processo de diferenciação celular passa a acontecer. As proteínas virais são expressas sequencialmente na medida em que ocorre a diferenciação natural do tecido. Somente no final

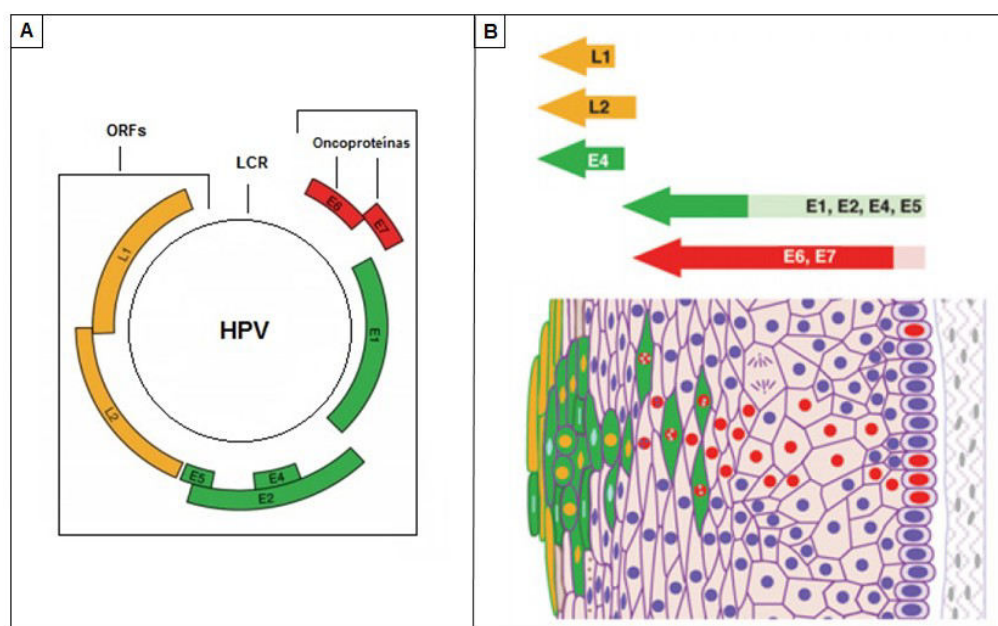


Figura 1: A) Genoma do HPV; B) Progressão viral no tecido epitelial escamoso e a expressão das proteínas iniciais (E) e tardias (L) do HPV. ORFs: Faixas abertas; LCR: Região de controle. Fonte: (Doorbar, 2006) (modificada).

do processo de diferenciação celular é que as proteínas tardias ou estruturais do HPV (L1 e L2) são expressas (Frazer, 2004).

O gene *E1* codifica a proteína viral E1, que é expressa logo após a infecção. Esta proteína contém três domínios funcionais, sendo que um deles é capaz de se ligar a E2, levando à formação do complexo denominado E1-E2. Este complexo se liga à região de replicação viral, que está localizada na LCR, e recruta proteínas essenciais para a replicação do vírus, como, por exemplo, topoisomerase I e DNA polimerase I. Além disso, tem sido demonstrado que a expressão do gene *E1* pode ativar uma resposta a danos no DNA e induzir uma parada na fase de síntese do ciclo celular (Wallace e Galloway, 2014; Araldi et al., 2017).

O gene *E2*, assim como *E1*, tem papel importante na transcrição de proteínas do HPV e na replicação viral. Sabe-se que *E2* também é um importante regulador epigenético, pois interage com duas histonas acetiltransferases, promovendo a hiperacetilação do gene promotor inicial do vírus e levando à expressão de E6 e E7. Sugere-se que a habilidade que E2 tem de interagir com ambas as transferases justifique o fato de estas enzimas responderem com uma menor intensidade aos danos do DNA humano. Essa interação efetiva leva à hipoacetilação do gene *TP53*, o que reduz o nível de expressão de p53 (Wallace e Galloway, 2014; Araldi et al., 2017).

A proteína viral E4, a mais expressa dos Papilomavírus, é facilmente detectada nos tecidos suprabasais e granulosos da epiderme infectada, podendo ser considerada um marcador importante da presença do HPV. Os produtos do gene *E4* interagem com proteínas filamentosas do citoesqueleto, estando associados à maturação do vírus e remodelamento da matriz extracelular, além de parecer otimizar a finalização do ciclo celular (Doorbar, 2013; Araldi *et al.*, 2017).

Ainda, o gene viral *E5* tem um papel importante no curso inicial da infecção, pois estimula o crescimento celular, mas não é obrigatório nos eventos tardios da carcinogênese mediada pelo HPV-AR (Boulet *et al.*, 2007). *E5* tem como uma de suas funções, inibir a expressão do Complexo Principal de Histocompatibilidade I (*Major Histocompatibility Complex I* - MHC I) e a Ciclo-oxigenase I (COX I), o que pode possibilitar a persistência da infecção viral (Araldi *et al.*, 2017). Além disso, essa proteína interfere na adesão da matriz celular e na diferenciação epitelial (Rampias *et al.*, 2014).

Por outro lado, *E6* e *E7* de HPV-AR são considerados proto-oncogenes que modulam o processo de transformação maligna do tecido infectado, sendo responsáveis pelo início e progressão da neoplasia cervical (Doorbar, 2006).

E6 possui aproximadamente 155 aminoácidos e pode interagir com diversas proteínas, dentre elas p53 e BAK, que levam as células a apoptose. Ambas podem ser inibidas e, consequentemente, o processo de imortalização celular ser induzido. *E6* também pode agir através da ativação das telomerasas e quinase SCR, que causam proliferação exacerbada das células. Além disso, pode interagir com diferentes proteínas promovendo a perda de contato intercelular e polaridade celular (Boulet *et al.*, 2007; Araldi *et al.*, 2017).

E7 inibe a proteína do retinoblastoma (pRb), p21 e p27, causando um aumento da proliferação celular. A inibição de pRb leva à liberação do fator de transição E2F, que regula a proteína p16. A inibição da p16 via *E7* permite a atuação sinérgica de *E6* e *E7* no processo de imortalização celular. *E7* também aumenta a atividade de ciclinas A/E através da expressão constitutiva do fator E2F, contribuindo para a proliferação celular e a amplificação dos centríolos, causando aneuploidia. Além disso, sugere-se que *E7* induza quebras na molécula de DNA, o que leva à desregulação do ciclo celular (Boulet *et al.*, 2007; Bosch *et al.*, 2013; Burroni *et al.*, 2013; Steenberg *et al.*, 2014; Araldi *et al.*, 2017).

Os genes *L1* e *L2* são expressos na fase tardia da infecção e codificam proteínas do capsídeo viral (Figura 1B). *L1* é uma ORF bastante conservada dentre os papilomavírus, sendo, portanto, importante na classificação viral. É expressa nas camadas epiteliais diferenciadas, de modo que sua imunodeteção seja considerada um indício importante de

infecção produtiva. A formação de novas partículas virais é possível uma vez que L1 é uma proteína capaz de se auto-organizar em estruturas pentaméricas que irão compor o capsídeo viral, possibilitando a infecção de outras células do tecido. L2 também está envolvida no transporte nuclear do DNA viral, além de permitir a entrada do HPV nas células do tecido do hospedeiro. L2 é capaz de evocar a produção de uma ampla gama de anticorpos neutralizantes contra diferentes tipos de HPV (Zur Hausen, 2002; Boulet et al., 2007; Choi e Park, 2016; Araldi et al., 2017).

Durante a fase produtiva da infecção viral (Figura 2A), em que o DNA do HPV se mantém episossomal, o genoma viral é empacotado e virions maduros são liberados após a expressão dos genes estruturais (L) nas células epiteliais maduras (Zur Hausen, 2002; Burroni et al., 2013). Caso a infecção persista e haja a integração do material genético do HPV ao DNA do hospedeiro, durante fase de transformação da infecção (Figura 2A), parte do gene viral E2 é perdida, levando à expressão exacerbada dos oncogenes E6 e E7, devido à perda da repressão da transcrição destes genes, mediada pela proteína viral E2. Como resultado, as células infectadas com o DNA do HPV integrado aumentam o tempo de vida, mantêm a capacidade de se proliferar, tendendo a desenvolver e perpetuar as mutações no DNA (Frazer, 2004).

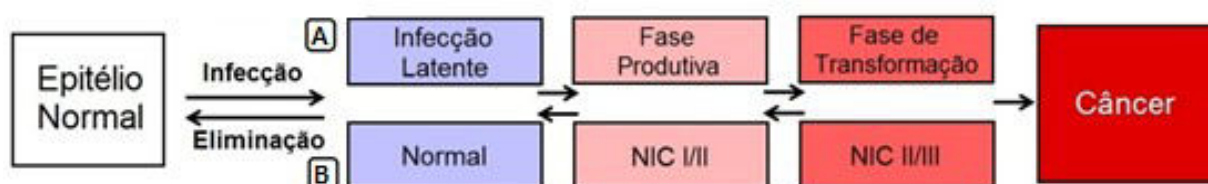


Figura 2: Carcinogênese cervical. **A)** História natural da infecção viral. **B)** Alterações celulares que ocorrem paralelamente à infecção pelo HPV. NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical. Fonte :Steenbergen et al., 2014 (modificado).

A infecção pelo HPV-AR é acompanhada por alterações celulares na região cervical (Figura 2B). Caso a infecção persista por um ou dois anos, o que ocorre em cerca de 10% dos casos, há o surgimento de lesões cervicais de baixo grau (Neoplasia Intraepitelial Cervical - NIC - de grau I ou II). Havendo a persistência por cinco anos ou mais, aproximadamente 2% das mulheres infectadas apresentam lesão cervical de alto grau (NIC II ou III). Estas lesões podem regredir espontaneamente. Tanto progressão quanto regressão podem estar associadas à ação do sistema imunológico e de outros cofatores, além do HPV. Entretanto, após décadas de persistência da infecção, as lesões de alto grau podem expandir invadindo o tecido (Gariglio et al., 2009; Schiffman e Wentzensen, 2013).

3.2. COFATORES ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES CERVICAIS

A infecção persistente pelo HPV é necessária, mas não suficiente para a carcinogênese cervical. Apenas um pequeno número de mulheres infectadas pelo vírus desenvolvem lesões pré-cancerosas e destas, aproximadamente 1% evoluem para o tumor cervical (Schiffman e Wentzensen, 2013).

Desta forma, a presença de outros fatores de risco associados à infecção por HPV é importante para o desenvolvimento do câncer cervical. Estes cofatores podem atuar tanto na persistência da infecção pelo HPV quanto na transformação maligna do tecido, estando ligados ao surgimento de lesões e à progressão destas ao câncer (Doorbar, 2006). Castellsagué e colaboradores (2002) classificaram os fatores de risco para o câncer cervical em três grupos: (1) Infecção por HPV-AR: variantes de HPV, carga viral e integração genética do vírus ao DNA do hospedeiro; (2) Cofatores ambientais ou exógenos: tabagismo, exposição à fumaça proveniente da queima de madeira, uso prolongado de contraceptivos orais, multiparidade, início precoce da atividade sexual, múltiplos parceiros, outras infecções sexualmente transmissíveis (*Chlamydia trachomatis*, HIV, HSV) e fatores nutricionais; (3) Cofatores intrínsecos ao hospedeiro: resposta imunológica, estado hormonal e fatores genéticos.

Dentre os fatores genéticos, o polimorfismo R72P no gene *TP53*, responsável por codificar a proteína p53, vem sendo associado de maneira controversa ao desenvolvimento de vários tipos de câncer, inclusive no colo uterino.

3.3. POLIMORFISMO NO CÓDON 72 DO GENE *TP53*

A fosfoproteína nuclear p53 é constituída por 393 aminoácidos, formando cinco regiões altamente conservadas e quatro domínios funcionais. Fisiologicamente, a p53 atua fazendo um ponto de checagem entre as fases G1 e S do ciclo celular. Em resposta a um sinal estressor, p53 é ativada por modificações pós-traducionais. Essas modificações estabilizam a p53 e aumentam seu nível intracelular, levando à sua ativação como um fator de transcrição que irá direcionar as células a respostas específicas, como apoptose, senescência celular ou prosseguimento do ciclo celular. Desta forma, p53 atua como ponto central nas respostas celulares ao estresse (Hrstka et al., 2016).

A p53 é codificada por *TP53*, o gene mais comumente mutado em cânceres humanos (cerca de 50 a 55% dos casos) (Sousa et al., 2011). Neste sentido, polimorfismos neste gene

vêm sendo associados ao risco de desenvolvimento de tumores no pulmão, mama, cérebro e de sarcomas (Whibley et al., 2009; Laprano et al., 2014; Assoumou et al., 2015). Além disso, existem evidências de que o gene *TP53* tem papel também na modulação da frequência e mecanismos de mutagênese durante o processo de carcinogênese (Dahabreh et al., 2013).

O polimorfismo R72P do gene *TP53* é caracterizado pela troca de um resíduo de guanina (G) por citosina (C) no códon 72, éxon 4, resultando na substituição do aminoácido Arginina (R) por Prolina (P), levando à codificação de proteínas com isoformas estruturais diferentes (Dahabreh et al., 2013; Hrstka et al., 2016).

A alteração da afinidade entre a p53 polimórfica (P) e a oncoproteína E6 do HPV, em relação à não-polimórfica (R), é um exemplo de alteração estrutural causada pelo polimorfismo R72P do gene *TP53* (Figura 3) (Sousa et al., 2011). Normalmente, a oncoproteína E6 de HPV-AR se liga à ubiquitina ligase associada à proteína E6-AP de modo a induzir a degradação da p53. Assim, o complexo E6/E6-AP se liga à p53 e promove interações com enzimas do sistema ubiquitina-proteassoma, e a posterior degradação de p53. Dessa forma, p53 perde a capacidade de exercer sua função fisiológica normal, como a indução à apoptose de células com material genético danificado e sem possibilidade de reparo. Consequentemente, há uma proliferação celular exacerbada, o que é considerado como passo fundamental para o surgimento de tumores (Whibley et al., 2009; Sousa et al., 2011) (Figura 3).

O polimorfismo R72P no gene *TP53* leve a uma interação menor entre p53 e E6/HPV, e, consequentemente, à diminuição de sua degradação pela oncoproteína viral, e manutenção do controle do ciclo celular (Figura 3). Assim, a presença deste polimorfismo poderia ser considerada um fator de proteção para o desenvolvimento do câncer cervical, uma vez que há menores taxas de p53 degradada (Figura 3) (Storey et al., 1998; Sousa et al., 2011). No entanto, estudos sobre a associação entre o polimorfismo R72P no gene *TP53* e a carcinogênese cervical, apresentam resultados controversos e inconclusivos, que parecem variar de acordo com a etnia e região geográfica. Assim, mais estudos são necessários visando melhor investigação desta associação (Humbey et al., 2002; Barbisan G1, 2011; Burrioni et al., 2013; Laprano et al., 2014; Chuery et al., 2017).

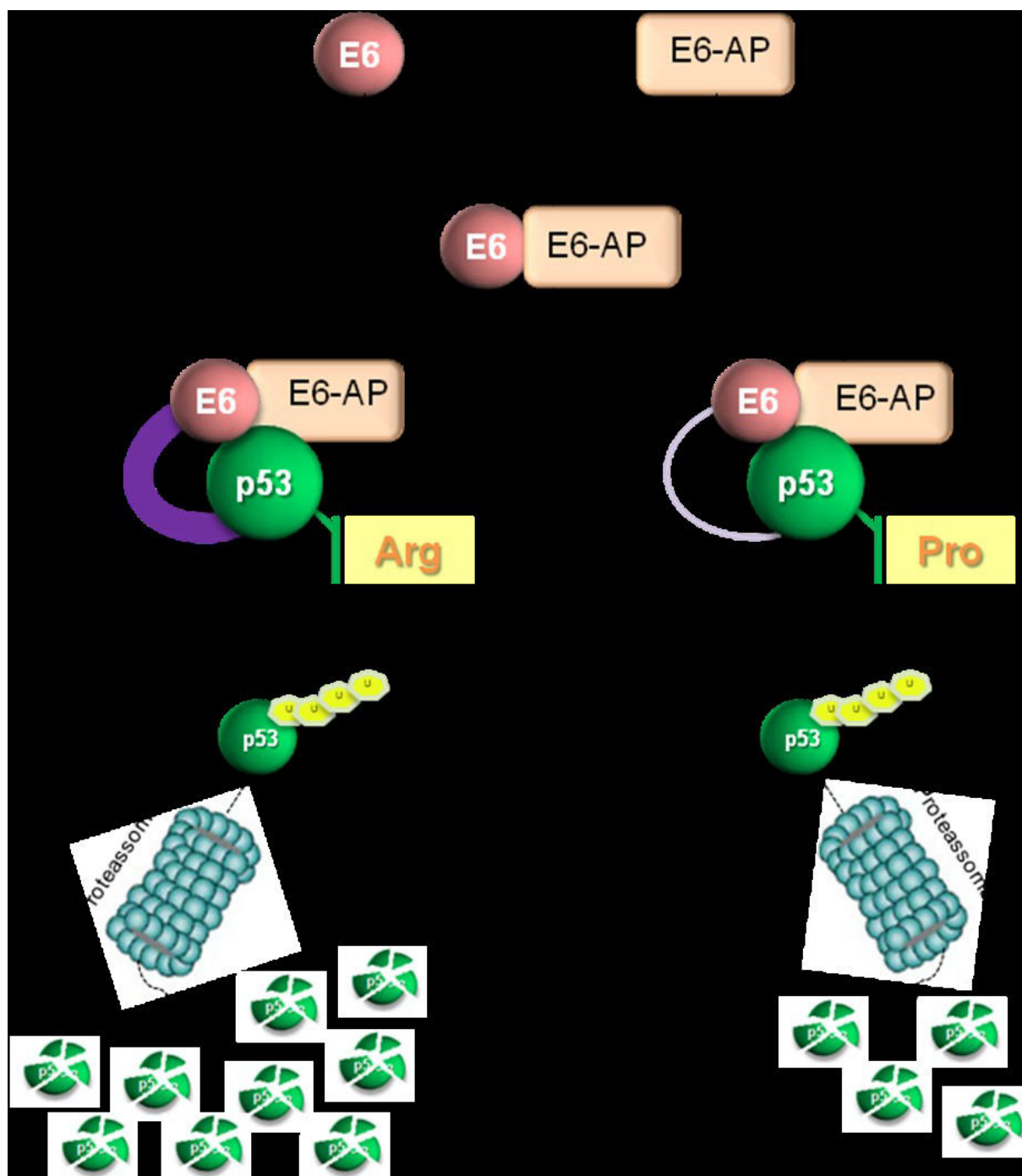


Figura 3: Interações entre E6/HPV e os genótipos de p53. E6/HPV se liga à E6-AP formando-se o complexo E6/E6-AP, que, por sua vez, se liga à p53. A) p53 não polimórfica (Arg) se liga mais fortemente ao complexo E6/E6-AP. B) p53 polimórfica (Pro) se liga ao complexo E6/E6-AP de maneira menos intensa. A ligação entre p53 e o complexo promove a poli-ubiquitinação de p53, levando ao reconhecimento e degradação de p53 pelo sistema ubiquitina-proteassoma. E6-AP: proteína associada a E6; Arg: arginina; Pro: prolina; U: ubiquitina. **Fonte:** Ghittoni et al., 2010 (modificada).

4. MÉTODOS

4.1. POPULAÇÃO DO ESTUDO

Este trabalho foi realizado com amostras de biópsias cervicais, fixadas por formol e incluídas em parafina (FFPE), obtidas dos arquivos do Laboratório Tafuri (LT), localizado em Belo Horizonte, Minas Gerais. O material foi coletado de mulheres do estado de Minas Gerais, no período de 2006 a 2013.

4.2. SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram divididas em grupos de acordo com o laudo histopatológico fornecido pelo LT (Figura 4). O grupo Controle foi composto por amostras apresentando cervicite (n=114). Por outro lado, o grupo de Casos (n=114) foi constituído de amostras apresentando diferentes graus de displasia cervical: NIC I (n=28), NIC II (n=28), NIC III (n=29) e Carcinoma Epidermoide Invasor (CEI) (n=29).

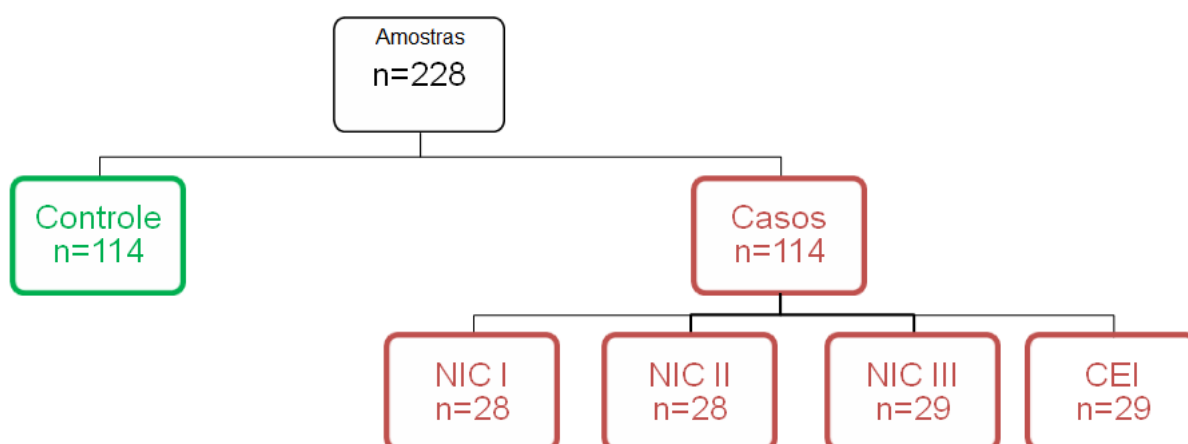


Figura 4: Definição da amostragem. NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical; CEI: Carcinoma Epidermoide Invasor.

As mulheres residentes em Ouro Preto e Itabirito (MG) foram contatadas e, após esclarecimento sobre o trabalho, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1A), permitindo que seu material fosse analisado. As amostras histológicas provenientes de mulheres de outras cidades bem como aquelas de pacientes não encontradas, foram avaliadas com o consentimento do LT (Anexo 1B), devido à impossibilidade de contatar as mulheres.

O processo de seleção das amostras e os procedimentos utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), CAAE: 0022.0.238.000-10 (Anexo 2).

4.3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

4.3.1. Preparação das amostras e extração de DNA

Para análise das amostras, foram utilizados três cortes histológicos de 10 µm de espessura de cada bloco de biópsia, obtidos no micrótomo MRP09® (Lupetec), acondicionados em microtubos de 1,5 mL e mantidos à temperatura ambiente até o momento do processamento.

Para a remoção da parafina, foram adicionados 1,5 mL de xilol aos cortes histológicos. Após centrifugação a 9.000rpm durante 3 minutos, o xilol foi descartado. Em seguida, 1,0 mL de etanol absoluto foi adicionado e as amostras foram novamente centrifugadas a 9.000rpm durante 3 minutos, tendo sido o sobrenadante descartado. As amostras foram incubadas a 37°C com as tampas dos microtubos abertas, até evaporação do etanol residual.

A extração de DNA foi realizada utilizando o Kit QIAamp® DNA FFPE Tissue (QIAGEN). Inicialmente, foram adicionados às amostras desparafinizadas, 20 µL de proteinase K e 180 µL de tampão de lise. Após incubação a 56°C por 12 horas, seguida de outra a 90°C por 60 minutos, a extração do DNA das amostras foi realizada de acordo com o protocolo descrito detalhadamente no Anexo 3. O DNA extraído foi armazenado a -80°C até o seu processamento.

4.3.2. Polimorfismo R72P no gene *TP53*

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando iniciadores específicos para cada alelo foi adaptada para investigação do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53*. As sequências dos iniciadores utilizados foram apresentadas na Tabela 1.

Nas reações, foram utilizados 12,5 µL de PCR Master Mix (0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0 unidade de Taq DNA, Promega®), 9,5 µL de água (*Nuclease Free-water*, Promega®), 1,0 µL de cada iniciador (10 pmol/µL). Foram testadas diferentes quantidades de DNA (ng): 10, 15, 30, 45 e 60.

O protocolo de reação foi padronizado: 94°C durante 4 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, extensão final a 72°C durante 10 minutos. Diferentes temperaturas de anelamento dos iniciadores foram avaliadas (°C): 55,0; 55,4; 56,1; 57,1; 58,2; 59,4; 60,6; 61,8; 62,9; 63,9; 64,9 e 65,6.

Os produtos de amplificação das reações foram identificados utilizando eletroforese em gel de agarose 2%, como descrito no item 4.3.2.

4.3.3. Pesquisa de HPV

A detecção do HPV nas amostras histológicas analisadas neste trabalho foi realizada por Silva (2015), utilizando a técnica PCR com o conjunto de iniciadores SPF (*Short PCR Fragment*) (Kleter et al., 1998). As sequências dos iniciadores foram apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para detecção do HPV desenhados por Ketler e colaboradores (1998) e para a genotipagem de *TP53*

Gene	Iniciadores	Sequência de nucleotídeos
p53 Arg (R)	Senso	TCCCCCTTGCCGTCCCAA
	Anti-senso	CTGGTGCAGGGGCCACGC
p53 Pro (P)	Senso	GCCAGAGGCTGCTCCCCC
	Anti-senso	CGTGCAAGTCACAGACTT
HPV	SPF 1A	GCiCAGGGiCACAATAATGG
	SPF 1B	GCiCAGGGiCATAACAATGG
	SPF 1C	GCiCAGGGiCATAATAATGG
	SPF 1D	GCiCAAGGiCATAATAATGG
	SPF 2B	GTiGTATCiACAACAGTAACAAA
	SPF 2D	GTiGTATCiACTACAGTAACAAA

Nas reações, foram utilizados 12,5 µL de PCR Master Mix (0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0 unidade de Taq DNA Polimerase, Promega®), 0,5 µL de cada iniciador (10 pmol/µL), 30 ng de DNA e água (*Nuclease Free-water*, Promega®) em quantidade suficiente para completar o volume da reação para 25,0 µL. O protocolo de reação foi padronizado: 94°C durante 1 minuto, seguido de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 45°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, extensão final a 72°C durante 5 minutos.

Os produtos de amplificação das reações foram identificados utilizando eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed[®] (Biotium) (4,0 µL/100 mL solução de agarose). Para aplicação em gel, foram utilizados 5,0 µL do produto amplificado e 1,0 µL de *Loading Dye Buffer 6X*[®] (Fermentas, 0,25% de azul de bromofenol, 15% de Ficol tipo 400). A fotodocumentação foi realizada pelo sistema de captura de imagem L-PIX Sti (Loccus[®]).

A presença do HPV foi confirmada naquelas amostras onde houve amplificação de fragmentos de 65 pares de base (pb).

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados pelo programa Microsoft Excel[®] 2010 e analisados pelo *software* SPSS para Windows versão 17.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) da frequência dos genótipos foi calculado através de uma ferramenta *on-line* (Rodriguez et al., 2009).

Foi realizada estatística descritiva (distribuição de frequência) e teste χ^2 para avaliação da associação entre a frequência do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* e a infecção pelo HPV, ou a presença de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas na cérvix uterina. Para avaliação do risco de lesões cervicais de acordo com o polimorfismo analisado foi calculada *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Valores de $p < 0,05$ foram considerados como evidência de associação significativa em todos os testes.

5. RESULTADOS

5.1. ADAPTAÇÃO DA TÉCNICA PARA ANÁLISE DO POLIMORFISMO R72P NO GENE *TP53* POR PCR ALELO ESPECÍFICA

Para otimização do protocolo de amplificação para análise do polimorfismo R72P no gene *TP53*, inicialmente foram avaliadas diferentes temperaturas de anelamento dos iniciadores para amplificação dos alelos não polimórfico e polimórfico. Foram observados melhores resultados com temperaturas entre 58,2°C e 65,6°C para a reação de amplificação do alelo não polimórfico (Figura 5A). Por outro lado, para amplificação do alelo polimórfico, melhores resultados foram observados com temperaturas que variaram de 55°C a 60,6°C (Figura 5B).

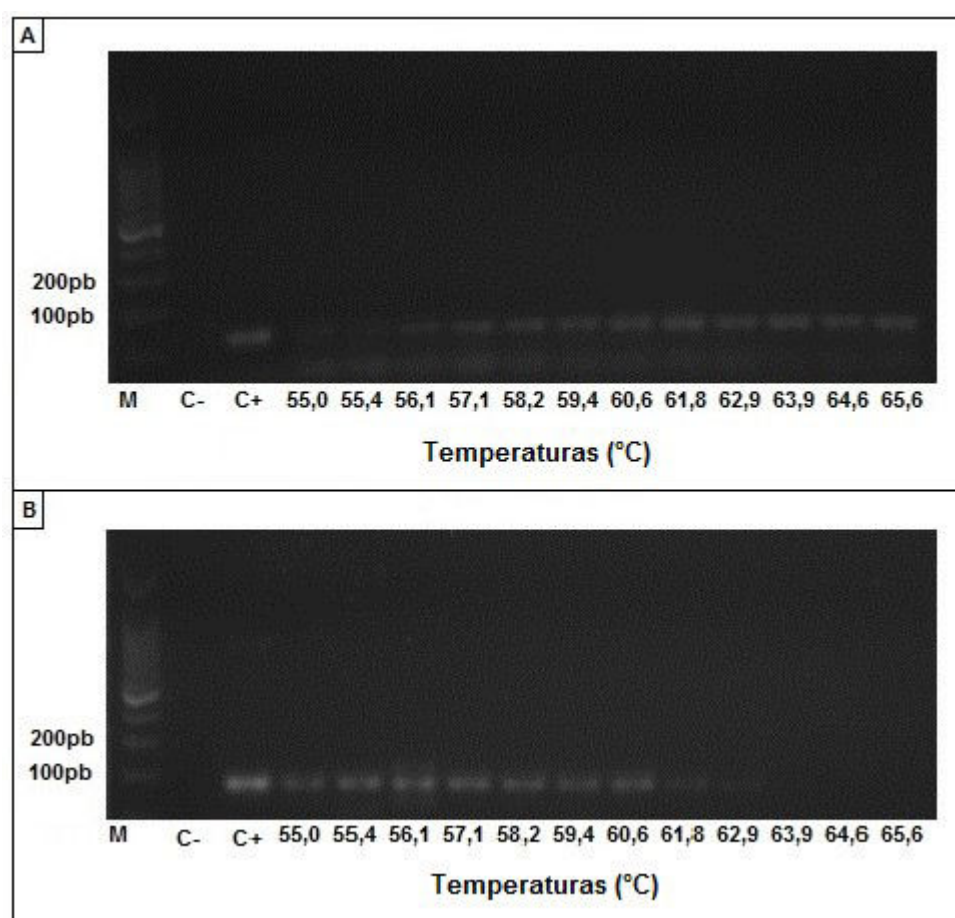


Figura 5: Determinação da temperatura de anelamento para amplificação por PCR na avaliação do polimorfismo R72P do gene *TP53*. **A)** Alelo não polimórfico R (141pb); **B)** Alelo polimórfico P (177pb). M, marcador de peso molecular; C-, controle negativo; C+: indivíduo heterozigoto para o polimorfismo avaliado.

Optou-se pela temperatura de anelamento 60°C para as duas reações e o protocolo final para genotipagem de *TP53* foi estabelecido: 4 minutos a 94°C (desnaturação), seguido de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto (desnaturação), 60°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão), seguidos por 10 minutos a 72°C (extensão final).

Definida a temperatura de anelamento, foi avaliada a quantidade de DNA (ng) a ser utilizada nas reações. Como pode ser visto na Figura 6, houve amplificação utilizando-se todas as quantidades de amostras testadas na amplificação dos dois alelos. Assim, optou-se por utilizar 30ng de DNA nas análises.

O protocolo completo utilizado para avaliar o polimorfismo por reação foi: 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega®), 1,0 µL de cada iniciador (10 pmol/µL), 30 ng de DNA e água (*Nuclease Free-water*, Promega®) em quantidade suficiente para completar o volume da reação para 25,0 µL.

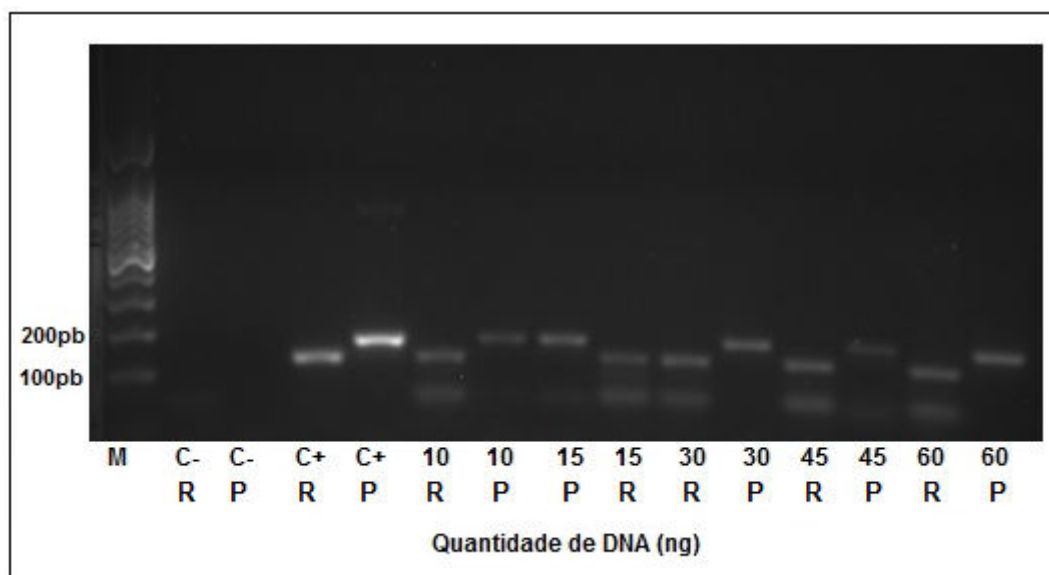


Figura 6: Avaliação da quantidade inicial de DNA de amostras parafinadas para amplificação por PCR na avaliação do polimorfismo R72P do gene *TP53*. M, marcador de peso molecular de 100pb; C-, controle negativo; C+: indivíduo heterozigoto para o polimorfismo avaliado; R: alelo não polimórfico (141pb); P: alelo polimórfico (177pb).

Após adaptação da técnica, o polimorfismo R72P no gene *TP53* foi analisado nas amostras cervicais parafinadas. A presença do fragmento de 141pb identificou indivíduos RR (não polimórficos), dois fragmentos (141pb e 177pb) caracterizaram indivíduos RP (heterozigotos), e um fragmento de 177pb indicou indivíduos PP (polimórficos) (Figura 7).

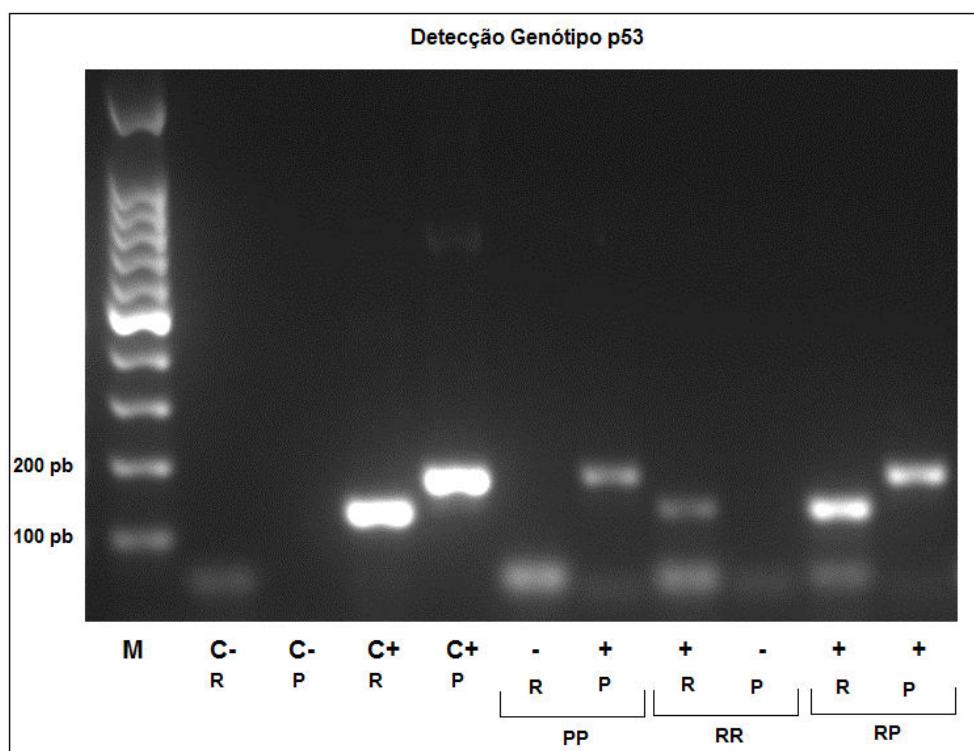


Figura 7: Gel de agarose representativo da análise do polimorfismo R72P do gene *TP53* por PCR alelo específica. M, marcador de peso molecular; C-: controle negativo; C+: indivíduo heterozigoto para o polimorfismo analisado; R: alelo não polimórfico (141pb); P: alelo polimórfico (177pb); PP: genótipo homozigoto polimórfico; RP: genótipo heterozigoto; RR: genótipo homozigoto não polimórfico.

5.2. FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO NO CÓDON 72 DO GENE *TP53*

A análise do polimorfismo R72P no gene *TP53* mostrou frequência de 45,6% (n=104) do genótipo não polimórfico (RR), 39,5% (n=90) de heterozigotos (RP) e 14,9% (n=34) de indivíduos polimórficos (PP) (Figura 8A).

Na avaliação da frequência alélica foi observado 61,0% do alelo não polimórfico (R) e 39,0% do alelo polimórfico (P) (Figura 8B).

A distribuição dos genótipos encontrou-se sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg (p=0,0682).

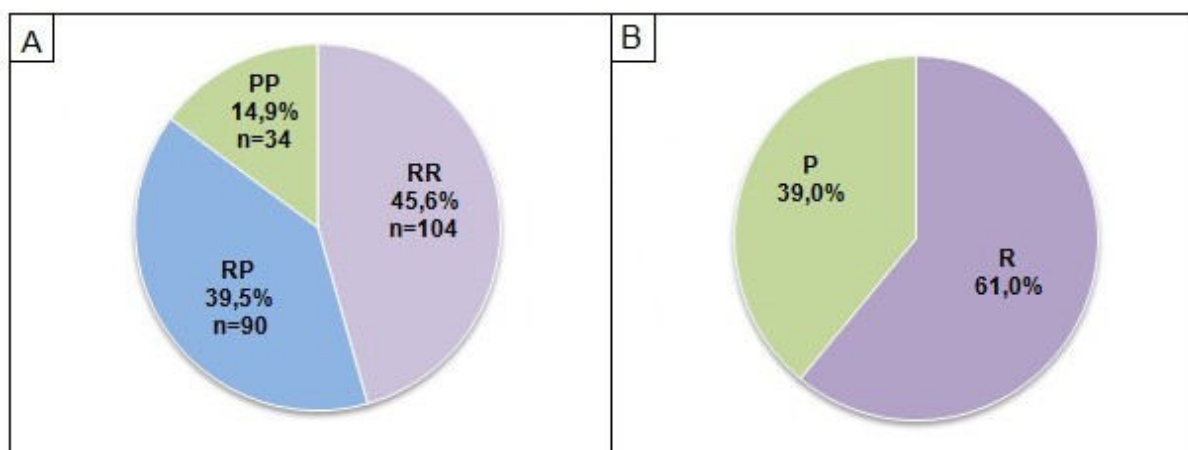


Figura 8: Frequência genotípica (A) e alélica (B) do polimorfismo R72P do gene *TP53*. RR: homozigoto não polimórfico; RP: heterozigoto; PP: polimórfico; R: Arginina; P: Prolina.

5.3. ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO NO CÓDON 72 DO GENE *TP53*, INFECÇÃO POR HPV E LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS DA CÉRVIX UTERINA

Independente do genótipo de p53, a infecção pelo HPV foi detectada em 95,6% (n=218) das amostras analisadas (Tabela 2). Frequências genotípicas e alélicas semelhantes foram observadas entre os grupos HPV+ e HPV-, não tendo sido observada diferença estatisticamente significativa entre os mesmos (genótipo: p=0,776; alelo: p=0,968).

Tabela 2: Associação entre o polimorfismo R72P no gene *TP53* e infecção por HPV.

Infecção por HPV	n (%)	Frequência Genotípica		p	Frequência Alélica		p
		n (%)			%		
		RR	RP + PP		R	P	
Não (HPV-)	10 (4,40)	5 (50,0)	5 (50,0)	0,776	61,5	38,5	0,968
Sim (HPV+)	218 (95,6)	99 (45,4)	119 (54,6)		61,0	39,0	

Por outro lado, associação estatisticamente significativa foi encontrada entre a distribuição do genótipo da proteína p53 e a presença de lesões intraepiteliais cervicais ou carcinoma epidermoide invasor (p=0,003) (Tabela 3). Maior frequência do genótipo não polimórfico (RR) foi observada no grupo de casos (n=63, 55,3%) se comparado ao grupo controle (n=41, 36%). Indivíduos RR apresentaram maior risco de lesões cervicais pré-

neoplásicas ou neoplásicas do que aqueles heterozigotos e polimórficos (RP+PP) [OR (IC95%): 2,199 (1,293-3,743), $p=0,004$] (Tabela 4).

Em relação aos alelos, foi observada maior frequência do alelo R no grupo de casos (65,1%) se comparado ao grupo controle (57,6%). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre a distribuição alélica do polimorfismo avaliado e a presença de lesões na cérvix uterina ($p=0,171$) (Tabela 3).

Tabela 3: Frequência genotípica e alélica da proteína p53 em relação às lesões no colo uterino e o risco de desenvolvimento de lesão cervical.

Lesão Cervical	n	Frequência Genotípica N (%)		P	Frequência Alélica %		p
		RR	RP + PP		R	P	
Controle	114	41 (36,0)	73 (64,0)	0,003	57,6	42,4	0,171
Casos	114	63 (55,3)	51 (44,7)		65,1	34,9	

Controle: cervicite; Casos: NIC I, II, III e CEI.

Tabela 4: Risco de desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas na cérvix uterina de acordo com o polimorfismo R72P no gene e *TP53*. Risco Relativo (OR) com Intervalo de Confiança (IC) de 95%.

Polimorfismo R72P no gene <i>TP53</i>	OR (IC 95%)	P
Genótipo		
RP+PP	1,0	
RR	2,199 (1,293-3,743)	0,004
Alelo		
P	1,0	
R	1,363 (0,828-2,244)	0,223

Em relação à gravidade das lesões no colo uterino, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a distribuição dos genótipos ($p=0,193$) ou dos alelos ($p=0,320$) do gene *TP53* (Tabela 5). Também não foi encontrada diferença comparando-se cada um dos grupos (controle, NICs I, II, III e CEI) separadamente.

Tabela 5: Associação entre o genótipo da proteína p53 e a gravidade da lesão cervical.

Lesão Cervical	N	Frequência Genotípica		P	Frequência Alélica		p
		n(%)			%		
		RR	RP + PP		R	P	
Controle*	29	14 (48,3)	15 (51,7)	0,193	59,5	40,5	0,320
NIC I	28	19 (67,9)	9 (32,1)		71,9	28,1	
NIC II	28	17 (60,7)	11 (39,3)		71,1	28,9	
NIC III	29	16 (55,2)	13 (44,8)		66,7	33,3	
CEI	29	11 (37,9)	18 (62,1)		51,4	48,6	

*Para comparação entre os grupos, foram incluídas, mediante sorteio, apenas 29 amostras histológicas no grupo controle.

6. DISCUSSÃO

6.1. POLIMORFISMO R72P NO GENE *TP53* E LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS DA CÉRVIX UTERINA

Estudos mostraram que a presença do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* acarreta em alterações na atividade da p53 (Storey et al., 1998; Soussi e Wiman, 2007; Hrstka et al., 2009). Por isso, a presença deste polimorfismo em diversas populações foi avaliada, a fim de associar os diferentes genótipos da p53 ao risco de desenvolvimento de vários tipos de tumores, uma vez que esta proteína é considerada a “guardiã do ciclo celular” sendo, portanto, importante no processo de carcinogênese (Whibley et al., 2009; Sousa et al., 2011; Dahabreh et al., 2013).

Neste trabalho, o efeito deste polimorfismo no processo da carcinogênese cervical foi avaliado frente às lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da cérvix uterina, e à infecção por HPV.

A proteína p53 não polimórfica é mais susceptível à degradação pelo HPV, através da ação da oncoproteína E6, do que a p53 polimórfica. Desta forma, a ausência do polimorfismo R72P no gene *TP53* poderia ser considerada um fator de risco no desenvolvimento do câncer cervical. Em 1998, Storey e colaboradores concluíram que mulheres com o genótipo RR seriam sete vezes mais susceptíveis ao desenvolvimento do câncer cervical associado ao HPV quando comparadas às heterozigotas. Desde então, estudos têm sido desenvolvidos nesse sentido em diversas regiões do mundo a fim de se conhecer melhor a relação entre o polimorfismo da p53 e a infecção por HPV, e assim, consequentemente, se determinar possíveis associações entre o câncer cervical e o genótipo da p53. Entretanto os resultados ainda são controversos e inconclusivos.

No presente estudo, maior porcentagem de indivíduos não polimórficos (RR) foi observada no grupo de casos. Além disso, mulheres com genótipo RR apresentaram risco duas vezes maior de lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas se comparadas aquelas com o alelo polimórfico (RP+PP). Isto pode ser explicado pela interação mais forte entre E6-AP e proteínas p53 não polimórficas, de modo que mais moléculas de p53 sejam poli-ubiquitinadas e posteriormente encaminhadas à degradação via proteassoma. Por outro lado, proteínas p53 polimórficas e E6-AP interagem menos intensamente, o que resulta em menor quantidade de p53 degradada pelo sistema ubiquitina-proteassoma.

De três metanálises mundiais realizadas entre 2009 e 2012, as duas com maior n amostral mostraram resultados similares ao deste estudo: genótipo RR considerado um fator de risco ao desenvolvimento de lesões cervicais. Já a metanálise com menor n amostral encontrou uma associação entre o polimorfismo e o câncer cervical em mulheres da China, Coreia e Japão, porém o genótipo polimórfico foi considerado um fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias cervicais em mulheres indianas (Klug et al., 2009; Zhou et al., 2012; Habbous et al., 2012).

Entretanto, outros estudos realizados com mulheres brasileiras não obtiveram resultados significativos da associação entre o polimorfismo avaliado e o risco de câncer no colo uterino (Brenna et al., 2004; Anschau et al., 2005; Laprano et al., 2014). O mesmo ocorreu com estudos realizados na Argentina, Portugal, França, Holanda e em países africanos (Van Duin et al., 2000; Humbey et al., 2002; Abba et al., 2003; Oliveira et al., 2008; Khair, 2010; Assoumou et al., 2015).

Ainda, estudos realizados em outros países da América Latina, o genótipo heterozigoto foi considerado um fator de risco para desenvolvimento do câncer cervical (Barbisan et al., 2011; Pina-Sanchez et al., 2011).

Existem poucos estudos na literatura que correlacionaram o polimorfismo R72P do gene *TP53* e a infecção pelo HPV (Van Duin et al., 2000; Humbey et al., 2002; Abba et al., 2003; Pina-Sanchez et al., 2011; Burrioni et al., 2013) (Anexo 4).

Neste trabalho, a maioria das amostras analisadas apresentou infecção por HPV (95,6%), o que pode ter prejudicado a interpretação dos resultados. Não foi observada associação entre a infecção viral e o polimorfismo analisado. Do mesmo modo, Anschau e colaboradores (2005) não observaram associação entre HPV e os genótipos de *TP53* entre mulheres brasileiras da região sul do país. Resultados similares também foram encontrados por trabalhos realizados na Argentina, Portugal, França, Marrocos e Gabão (Humbey et al., 2002; Abba et al., 2003; Oliveira et al., 2008; Khair, 2010; Assoumou et al., 2015).

Por outro lado, o genótipo não polimórfico foi considerado fator de risco para a infecção viral entre mulheres brasileiras do estado de São Paulo (Chuery et al., 2017), e para a infecção por HPV 16 entre italianas e holandesas (Van Duin et al., 2000; Burrioni et al., 2013). Além disso, Barbisan e colaboradores (2011) e Piña-Sanchez e colaboradores (2010) constataram que apenas o genótipo heterozigoto foi fator de risco para infecção por HPV ou HPV 16/18 em relação aos demais tipos virais.

A maioria dos estudos foi realizada com amostras frescas (Anexo 4). No presente trabalho, foram utilizadas amostras cervicais fixadas por formol e incluídas em parafina (FFPE), e

sabe-se que o tipo de amostra utilizada também pode interferir nos resultados. Diferentemente de amostras frescas, a fixação do tecido permite que a integridade do material seja mantida por maior intervalo de tempo, com a preservação dos ácidos nucleicos. Além disso, as contaminações por microrganismos e a decomposição não acontecem comumente. Entretanto, a fixação sofre interferências de vários fatores, como a temperatura e tempo de armazenamento, ou o tamanho do tecido. Além disso, a quantidade excessiva do agente fixador também pode interferir negativamente na eficiência da extração do material genético, além de afetar a PCR através do bloqueio estérico da DNA polimerase (Kocjan et al., 2016).

Além do tipo de amostra utilizada, outras questões devem ser consideradas como limitações neste estudo, como o pequeno tamanho amostral, que dificultou as análises estatísticas, e a ausência de dados sobre outros cofatores relacionados à carcinogênese cervical, dentre eles, pode-se citar informações sobre o início da atividade sexual, número de parceiros, multiparidade, tabagismo e etilismo, presença de outras doenças sexualmente transmissíveis, dentre outros fatores genéticos.

Assim, as diferenças nos resultados dos diferentes estudos podem ser justificadas pela genética dos indivíduos avaliados, que varia de acordo com as populações estudadas e pode interferir no papel do polimorfismo avaliado sobre a carcinogênese cervical. Além disso, o tipo de amostra e as metodologias utilizadas para avaliação do polimorfismo, bem como o número de amostras avaliadas devem ser levados em consideração na interpretação dos resultados.

6.2. FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO NO CÓDON 72 DO GENE *TP53* EM AMOSTRAS CERVICAIS

Poucos trabalhos avaliaram a frequência do polimorfismo R72P no gene *TP53* em amostras parafinadas bem como sua associação à carcinogênese cervical. Este trabalho foi o primeiro que determinou a frequência do polimorfismo R72P *TP53* nestas amostras no estado de Minas Gerais. Foi realizado em Ouro Preto e identificou, no grupo avaliado, 45,6% de mulheres não polimórficas, 39,5% heterozigotas e 14,9% polimórficas. O Anexo 5 lista os estudos que descreveram a frequência do polimorfismo R72P *TP53* em amostras cervicais em diferentes países e localidades.

No Brasil, um trabalho realizado no estado do Rio Grande do Sul, apresentou frequência genotípica de polimórficos semelhante (10,2%) à de Minas Gerais (Anschau et al.,

2005). Também foram observadas frequência similares de indivíduos PP (10,2%) por Abba e colaboradores (2003) em um trabalho também realizado com mulheres argentinas.

Por outro lado, Chuery e colaboradores (2017) observaram maior frequência do genótipo PP em mulheres do estado de São Paulo (25,7%). Além disso, é interessante destacar que não foram encontrados indivíduos com o polimorfismo em amostras cervicais parafinadas em outro estudo realizado também no estado de São Paulo (Brenna et al., 2004).

Menores porcentagens do genótipo polimórfico (5,9%) foram observadas em outros países latino-americanos, como na Argentina e México (Barbisan et al., 2011; Pina-Sanchez et al., 2011). Menores taxas do genótipo PP também foram observadas em trabalhos realizados na Europa, com mulheres sérvias, italianas, francesas e holandesas. Nestes, a frequência de indivíduos PP variou de 0,7% a 7,9% (Van Duin et al., 2000; Humbey et al., 2002; Burrioni et al., 2013; Malisic et al., 2013).

Foi encontrado apenas um estudo realizado na China (PP: 24,2%) e dois entre mulheres africanas. Dentre estes, constatou-se 28,6% do genótipo PP no Marrocos, e 14,7% no Gabão (Khair, 2010; Yang et al., 2014; Assoumou et al., 2015).

De acordo com Khair (2010) e Beckman e colaboradores (1994), populações mais próximas à linha do equador tendem a possuir maior frequência do alelo polimórfico (P), enquanto a frequência do alelo não polimórfico é maior nas regiões polares. Isso explica as baixas frequências de PP entre os países europeus (Van Duin et al., 2000; Humbey et al., 2002; Burrioni et al., 2013; Malisic et al., 2013). No Brasil, um país de grande extensão territorial, observa-se uma população altamente miscigenada, apresentando diferenças não só entre suas regiões geográficas como também entre os estados que as compõem. Isto pode explicar, em partes, os resultados obtidos neste estudo.

Este foi o primeiro estudo de frequências do polimorfismo R72P em mulheres de Minas Gerais em amostras cervicais parafinadas. Anschau e colaboradores (2005) descreveram no Rio Grande do Sul frequências similares às deste estudo em amostras frescas. Já Laprano e colaboradores (2014) encontraram frequência similar do genótipo polimórfico em amostras de sangue periférico coletadas no Ceará.

Por outro lado, um estudo realizado em São Paulo com amostras não parafinadas descreveu maior frequência de polimórficos (Chuery et al., 2017). E em outro estudo realizado em São Paulo, é interessante destacar que não foram encontrados genótipos polimórficos em amostras parafinadas (Brenna et al., 2004).

Chuery e colaboradores (2017) também constataram aumento do risco de câncer cervical entre mulheres brasileiras com genótipo não polimórfico (RR). Trabalhos realizados na China e na Europa corroboram com estes resultados (Oliveira et al., 2008; Burroni et al., 2013; Malisic et al., 2013; Yang et al., 2014).

7. CONCLUSÃO

O genótipo não polimórfico (RR) do códon 72 do gene *TP53* parece atuar como um fator de risco para lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da cérvix uterina em comparação àqueles que carregam o alelo polimórfico. Por outro lado, o polimorfismo R72P no gene *TP53* não foi associado a infecções pelo HPV.

8. REFERÊNCIAS

- ABBA, M. C. et al. The p53 codon 72 genotypes in HPV infection and cervical disease. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 109, n. 1, p. 63-6, Jul 2003. ISSN 0301-2115.
- ANSCHAU, F. et al. Association of codon 72 polymorphism with premalignant and malignant cervical lesions. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 27, n. 10, p. 607-612, Out 2005 2005. ISSN 0100-7203.
- ARALDI, R. P. et al. Papillomaviruses: a systematic review. **Genet Mol Biol**, v. 40, n. 1, p. 1-21, Jan-Mar 2017. ISSN 1415-4757.
- ASSOUMOU, S. Z. et al. The preliminary study of p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical carcinoma in Gabonese women. **Med Oncol**, v. 32, n. 1, p. 281, Jan 2015. ISSN 1559-131X.
- BARBISAN, G. et al. The effect of TP53 codon 72 and RNASEL codon 462 polymorphisms on the development of cervical cancer in Argentine women. **Cancer Genet**, v. 204, n. 5, p. 270-7, Mai 2011. ISSN 2210-7762.
- BOSCH, F. X. et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. **Vaccine**, v. 31 Suppl 6, p. G1-31, Dez 2013. ISSN 1873-2518.
- BOULET, G. et al. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 11, p. 2006-11, 2007. ISSN 1357-2725.
- BRENNA, S. M. F. et al. Prevalence of codon 72 P53 polymorphism in Brazilian women with cervix cancer. **Genet. Mol. Biol.**, v. 27, n. 4, p. 496-499, 2004. ISSN 1415-4757.
- BURRONI, E. et al. Codon 72 polymorphism of p53 and HPV type 16 E6 variants as risk factors for patients with squamous epithelial lesion of the uterine cervix. **J Med Virol**, v. 85, n. 1, p. 83-90, Jan 2013. ISSN 0146-6615.
- CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. **Virus Res**, v. 89, n. 2, p. 191-9, Nov 2002. ISSN 0168-1702.
- CHOI, Y. J.; PARK, J. S. Clinical significance of human papillomavirus genotyping. **J Gynecol Oncol**, v. 27, n. 2, Mar 2016. ISSN 2005-0380.
- CHUERY, A. C. S. et al. Association between the p53 arginine/arginine homozygous genotype at codon 72 and human papillomavirus E6/E7 mRNA expression. **Braz J Infect Dis**, v. 21, n. 3, p. 248-254, Mai - Jun 2017. ISSN 1413-8670.

DAHABREH, I. J. et al. Genotype misclassification in genetic association studies of the rs1042522 TP53 (Arg72Pro) polymorphism: a systematic review of studies of breast, lung, colorectal, ovarian, and endometrial cancer. **Am J Epidemiol**, v. 177, n. 12, p. 1317-25, Jun 2013. ISSN 0002-9262.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin Sci (Lond)**, v. 110, n. 5, p. 525-41, Mai 2006. ISSN 0143-5221.

DOORBAR, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 80-98, Out 2013. ISSN 0042-6822.

FRAZER, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 1, p. 46-54, Jan 2004. ISSN 1474-1733.

GARIGLIO, P. et al. The role of retinoid deficiency and estrogens as cofactors in cervical cancer. **Arch Med Res**, v. 40, n. 6, p. 449-65, Ago 2009. ISSN 1873-5487.

GHITTONI, R. et al. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. **Virus Genes**, v. 40, n. 1, p. 1-13, Fev 2010. ISSN 0920-8569.

HABBOUS, S. et al. p53 Arg72Pro Polymorphism, HPV Status and Initiation, Progression, and Development of Cervical Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Dez 2012.

HRSTKA, R. et al. Polymorphisms in p53 and the p53 pathway: roles in cancer susceptibility and response to treatment. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 3, p. 440-453, 2016. ISSN 1582-4934.

HUMBEY, O. et al. TP53 polymorphism at exon 4 in caucasian women from eastern France: lack of correlation with HPV status and grade of cervical precancerous lesions. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 103, n. 1, p. 60-4, Jun 2002. ISSN 0301-2115.

IARC. **Globocan 2012: Cancer Incidence and Mortality in 2012**. France: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization 2012.

INCA. **Estimativa dos Casos de Câncer no Brasil - 2016**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tabelaestados.asp?UF=BR>>. Acesso em 03 de agosto de 2017.

INCA. **Incidência de Câncer no Brasil - 2016**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/mapa.asp?ID=5>>. Acesso em 03 de agosto de 2017.

KHAIR, E. M. M., et al. p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical carcinoma in Moroccan women. **Medical Oncology**, v. 27, n. 3, p. 861–866, Set 2010. ISSN 1559-131X.

KLETER, B. et al. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. **Am J Pathol**, v. 153, n. 6, p. 1731-9, Dez 1998. ISSN 0002-9440.

KOCJAN, B. J.; HOSNJAK, L.; POLJAK, M. Detection of alpha human papillomaviruses in archival formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue specimens. **J Clin Virol**, v. 76 Suppl 1, p. S88-s97, Mar 2016. ISSN 1386-6532.

LAPRANO, T. D. et al. Association of TP53 codon 72 and intron 3 16-bp Ins/Del polymorphisms with cervical cancer risk. **Tumour Biol**, v. 35, n. 8, p. 7435-40, Ago 2014. ISSN 1010-4283.

MALISIC, E. et al. TP53 codon 72 polymorphism and risk of cervical carcinoma in Serbian women. **Arch Gynecol Obstet**, v. 288, n. 3, p. 621-5, Set 2013. ISSN 0932-0067.

OLIVEIRA, S. et al. The p53 R72P polymorphism does not influence cervical cancer development in a Portuguese population: a study in exfoliated cervical cells. **J Med Virol**, v. 80, n. 3, p. 424-9, Mar 2008. ISSN 0146-6615 (Print)0146-6615.

PINA-SANCHEZ, P. et al. Polymorphism in exon 4 of TP53 gene associated to HPV 16 and 18 in Mexican women with cervical cancer. **Med Oncol**, v. 28, n. 4, p. 1507-13, Dez 2011. ISSN 1357-0560.

RAMPIAS, T.; SASAKI, C.; PSYRRI, A. Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. **Oral Oncol**, v. 50, n. 5, p. 356-63, Mai 2014. ISSN 1368-8375.

RODRIGUEZ, S.; GAUNT, T. R.; DAY, I. N. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. **Am J Epidemiol**, v. 169, n. 4, p. 505-14, Fev 2009. ISSN 1476-6256.

SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 22, n. 4, p. 553-60, Abr 2013. ISSN 1538-7755.

SILVA, N. N. T.; Polimorfismo C677T no Gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase e r risco de desenvolvimento do Câncer Cervical. 2015, 73; **Escola de Farmácia**, Universidade Federal de Ouro Preto.

SOUSA, H. et al. Is there a biological plausability for p53 codon 72 polymorphism influence on cervical cancer development? **Acta Med Port**, v. 24, n. 1, p. 127-34, Jan-Fev 2011. ISSN 0870-399X.

SOUSSI, T.; WIMAN, K. G. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. **Cancer Cell**, v. 12, n. 4, p. 303-12, Out 2007. ISSN 1535-6108.

STEENBERGEN, R. D. et al. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. **Nat Rev Cancer**, v. 14, n. 6, p. 395-405, Jun 2014. ISSN 1474-1768.

STOREY, A. et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. **Nature**, v. 393, n. 6682, p. 229-34, Mai 1998. ISSN 0028-0836.

VAN DUIN, M. et al. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. **J Gen Virol**, v. 81, n. Pt 2, p. 317-25, Fev 2000. ISSN 0022-1317.

WALLACE, N. A.; GALLOWAY, D. A. Manipulation of cellular DNA damage repair machinery facilitates propagation of human papillomaviruses. **Semin Cancer Biol**, v. 26, p. 30-42, Jun 2014. ISSN 1044-579X.

WHIBLEY, C.; PHAROAH, P. D.; HOLLSTEIN, M. p53 polymorphisms: cancer implications. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 2, p. 95-107, Fev 2009. ISSN 1474-175X.

YANG, S. D. et al. Association of a miR-502-binding site single nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of SET8 and the TP53 codon 72 polymorphism with cervical cancer in the Chinese population. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 16, p. 6505-10, 2014. ISSN 1513-7368.

ZHOU, X.; GU, Y.; ZHANG, S. L. Association between p53 codon 72 polymorphism and cervical cancer risk among Asians: a HuGE review and meta-analysis. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 13, n. 10, p. 4909-14, 2012. ISSN 1513-7368.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-50, Mai 2002. ISSN 1474-175X.

9. ANEXOS

ANEXO 1A:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(para utilização de amostras histológicas coletadas anteriormente a este projeto)

“ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE CICLO CELULAR E DE PROLIFERAÇÃO NAS LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS”

Prezada paciente _____

Você está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa sobre o câncer de colo uterino e o papilomavírus humano, também chamado de HPV, principal causa destes tumores.

Neste projeto, queremos estudar o material de mulheres que tiveram alterações diferentes no colo uterino (leves a mais graves) para buscar um marcador que possa ser usado para auxiliar no diagnóstico. Sabe-se que a grande maioria das lesões pré-malignas de colo uterino não progredirá para lesões mais acentuadas ou até mesmo para câncer. Entretanto, nos dias de hoje, não está disponível nenhum marcador para estabelecer qual lesão irá progredir e qual não irá progredir. Assim, pode ser que estejam sendo realizados tratamentos desnecessários em lesões que nunca progrediriam para casos mais graves. Entretanto, como o câncer é uma doença de difícil tratamento nos estágios mais avançados, a opção é fazê-lo em qualquer lesão que tenha o risco de progredir.

Você realizou há algum tempo um exame preventivo de câncer de colo uterino (Papanicolaou) que mostrou alterações que levaram o seu médico a solicitar um exame chamado colposcopia. Neste exame, realizado no Centro Viva Vida em Itabirito, o médico analisou o colo uterino com uma lente de aumento. Como você apresentou alteração na colposcopia, foi feita uma biópsia, que é a retirada de uma pequena porção do colo uterino para ser examinada em laboratório através de microscópio (exame histológico). O exame histológico foi realizado no Laboratório Tafuri em Belo Horizonte e forneceu o diagnóstico definitivo das alterações encontradas em seu colo uterino. De posse deste resultado você, provavelmente foi realizado o tratamento. No exame histológico geralmente é analisado apenas uma pequena porção do material obtido nas biópsias. O restante é mantido em arquivo no laboratório, em pequenos blocos feitos de parafina, durante alguns anos e, depois, descartado no lixo hospitalar, pois não tem mais utilidade.

O que estamos solicitando a você é a autorização para utilização dos blocos de parafina da biópsia que você realizou, para ser estudado em nosso projeto de pesquisa. O material que

pretendemos utilizar é excedente, ou seja, já foi usado para o seu diagnóstico no passado e agora não possui mais utilidade para você, já que o seu laudo foi emitido, aceito pelo médico e o tratamento já estabelecido. Esclarecemos que o bloco de parafina com a biópsia somente será retirado do Laboratório Tafuri se você nos der autorização, assinando este Termo de Consentimento.

Sua participação nesse projeto é voluntária. Você não terá nenhuma vantagem direta em ceder suas amostras para o projeto porque provavelmente já realizou tratamento para as lesões de colo uterino que possuía. Na verdade, participando do projeto você poderá estar ajudando outras pessoas no futuro para que o tratamento das lesões de colo uterino seja mais melhorado.

Caso o estudo seja interrompido, o bloco de parafina com a biópsia será devolvido ao Laboratório Tafuri.

Os dados serão armazenados em um computador disponibilizado na sala da professora Angélica Alves Lima, coordenadora deste estudo, na Escola de Farmácia da UFOP, localizada à Rua Costa Sena, 171, Centro, Ouro Preto. A professora Angélica é responsável pela guarda de seu bloco de biópsia e das informações obtidas a partir dele.

Seu nome ou informações que venham a identificar você em nenhum momento serão revelados e garantiremos seu anonimato em publicações científicas que venhamos a realizar.

Você poderá esclarecer qualquer dúvida sobre o projeto com a Prof^a. Angélica Alves Lima ou com o Prof. Roney Luiz de Carvalho Nicolato, de segunda a sexta-feira, de 8:00 às 11:00 e de 13:00 às 17:00 horas, no LAPAC ou pelo telefone (31) 3559-1646. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto no Campus Universitário, Morro do Cuzeiro, ICEB II, sala 29, pelos telefones (31)3559-1368 ou (31)3559-1370 ou pelo e-mail propp@ufop.br

Desde já, agradecemos sua colaboração.

Eu, _____, após ser esclarecida sobre o projeto de pesquisa, concordo em participar do estudo acima.

Assinatura da Paciente

Assinatura da Coordenadora

Ouro Preto, ____ de _____ de 20

ANEXO 1B: Autorização do LT para utilização dos blocos de biópsia para ações previstas neste projeto

Belo Horizonte, 28 de abril de 2011.



LABORATÓRIO TAFURI DE PATOLOGIA

Ilma. Profa. Dra.

Olívia Maria de Paula Alves Bezerra

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa / UFOP

Prezada Coordenadora,

Autorizo a retirada de blocos de biópsias de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical/carcinoma, armazenados no Laboratório Tafuri, para completar a amostragem do Projeto de Pesquisa intitulado "Análise da Expressão de Proteínas de Ciclo Celular e de Proliferação nas Lesões Intraepiteliais Cervicais", coordenado pela Professora Dra. Angélica Alves Lima, do Departamento de Análises Clínicas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

Esclareço que, como colaborador, estou ciente da necessidade e importância da análise da amostragem definida no projeto.

Dr. Alexandre Tafuri
Médico Anátomo-Patologista
Sócio-Proprietário do Laboratório Tafuri de Patologia LTDA

Exames de prevenção - Citologias - Biópsias - Imuno-histoquímica

Rua São Paulo, 893 - Conj. 1009 - 30170-131 - Centro - Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil

(31) 3273-2503

www.laboratoriotafuli.com.br

ANEXO 2: Aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Ouro Preto (CEP/UFOP)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Campus: Universitário - Morro do Cruzeiro
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1385 Fax: (31) 3559-1370



OFÍCIO CEP Nº. 015/2013, de 1 de fevereiro de 2013.

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Angélica Alves Lima

DEACL/ENUT/UFOP

Senhora Pesquisadora,

É com prazer que comunicamos a **Aprovação**, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto, do adendo ao seu projeto intitulado "*Análise da expressão de proteínas de ciclo celular e de proliferação nas lesões intraepiteliais cervicais.*" (CAAE: 0022.0.238.000-10), que solicita autorização para inclusão de avaliação de marcadores bioquímicos, inflamatórios, genéticos e de matriz tecidual no material que já está em análise. Em relação a alteração do título do projeto de pesquisa, o mesmo foi cadastrado no SISNEP com o título anterior, portanto para alterar o mesmo, deverá ser realizado novo cadastro na Plataforma Brasil, pois o CAAE está diretamente ligado ao título do projeto.

Atenciosamente,

Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Federal de Ouro Preto

ANEXO 3: Protocolo de extração de DNA de amostras histológicas: QIAamp® DNA FFPE Tissue (QIAGEN)

1. Adicionar 180µL do tampão ATL e 20µL de proteinase K;
2. Homogeneizar (vortex);
3. Incubar a 56°C durante a noite;
4. Incubar a 90°C por 60 minutos (só colocar a amostra no termobloco depois que este tiver atingido a temperatura de 90°C);
5. Centrifugar rapidamente apenas para remover algum resíduo de amostra que esteja na tampa do microtubo;
6. Adicionar 200µL do Tampão AL;
7. Homogeneizar (vortex);
8. Adicionar 200µL de etanol (96-100%);
9. Homogeneizar (vortex);
10. Centrifugar rapidamente apenas para remover algum resíduo de amostra que esteja na tampa do microtubo;
11. Transferir a amostra para uma coluna;
12. Centrifugar a 8000rpm por 1min;
13. Trocar a coluna para um novo tubo coletor de 2mL;
14. Adicionar 500µL do tampão AW1;
15. Centrifugar a 8000rpm por 1min;
16. Trocar a coluna para um novo tubo coletor de 2mL;
17. Adicionar 500µL do tampão AW2;
18. Centrifugar a 8000rpm por 1min;
19. Trocar a coluna para um novo tubo coletor de 2mL;
20. Centrifugar a 14000rpm por 3min;
21. Transferir a coluna para um microtubo de 1,5mL;
22. Adicionar 100µL do tampão ATE;
23. Aguardar 1 min;
24. Centrifugar a 14000rpm por 1min;
25. Descartar a coluna;
26. Armazenar a solução de DNA no microtubo a uma temperatura de -80°C.

ANEXO 4: Frequências do genótipo da p53 e associação com infecção por HPV e/ou câncer cervical em relação ao país/etnia, metodologia, amostras e tipo de amostra avaliada.

Estudo	País	Metodologia	n amostral	Tipo amostra	Genótipo TP53 % (RR/RP/PP)	Associação com NIC e/ou câncer cervical	Associação com a infecção pelo HPV
Storey et al, 1998	Inglaterra	PCR	-	FFPE Fresca	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Arg/Arg fator de risco	-
Van Duin et al, 2000	Holanda	PCR alelo específica	246	FFPE	Casos: 51,3/43,7/5,0 Controle: 57,0/40,0/3,0 Total: 53,2/42,3/4,5	Sem associação	Arg/Arg fator de risco para HPV 16
Humby et al, 2002	França	PCR e Sequenciamento	138	Fresca	Total: 48,6/50,7/0,7	Sem associação	Sem associação
Abba et al, 2003	Argentina	PCR	295	Fresca	Casos: 37,8/51,1/11,1 Controle: 42,9/47,3/9,8 Total: 41,3/48,5/10,2	Sem associação	Sem associação
Oliveira et al, 2008	Portugal	PCR alelo específica e RT-PCR	575	Fresca	Arg/Arg: 51,6 Arg/Pro + Pro/Pro: 48,4	Arg/Arg fator de risco	Sem associação
Klug et al, 2009	Meta-análise: Mundial	-	15834	-	Casos: 44,8/42,2/13,0 Controle: 45,8/43,5/10,7 Total: 45,3/42,8/11,9	Arg/Arg fator de risco comparado a Arg/Pro	-
Piña-Sánchez et al, 2010	México	PCR Sequenciamento	237	Sangue periférico: polimorfismo. Fresca: HPV	Casos: 59,5/31,5/9,0 Controle: 73,0/23,8/3,2 Total: 66,7/27,4/5,9	Arg/Pro fator de risco	Arg/Pro fator de risco para HPV 16 ou 18 em relação a outros HPVs
Meftah et al, 2010	Marrocos	PCR alelo específica e PCR-RFLP	213	Fresca	Casos: 16,8/50,4/32,7 Controle: 18,0/58,0/24,0 Total: 17,4/54,0/28,6	Sem associação	Sem associação
Estudo	País	Metodologia	n amostral	Tipo amostra	Genótipo TP53 % (RR/RP/PP)	Associação com NIC e/ou câncer cervical	Associação com a infecção pelo HPV

Estudo	País	Metodologia	n amostral	Tipo amostra	Genótipo <i>TP53</i> % (RR/RP/PP)	Associação com NIC e/ou câncer cervical	Associação com a infecção pelo HPV
Barbisian et al, 2011	Argentina	PCR	221	FFPE	Casos: 42,9/54,1/3,1 Controle: 56,1/35,8/8,1 Total: 50,2/43,9/5,9	Arg/Pro fator de risco	Arg/Pro fator de risco
Habbous et al, 2012	Meta-análise: Mundial	-	12667	-	-	Arg/Arg fator de risco	
Zhou, Gu e Zhang, 2012	Meta-análise: Ásia	-	7407	-	-	Índia: Pro/Pro fator de risco China, Coreia e Japão: Sem associação	-
Burroni et al, 2013	Itália	PCR-RFLP	254	Fresca Histológica	Amostras frescas: 47,2/44,9/7,9 Amostras histológicas: 47,6/44,9/7,9	Arg/Arg fator de risco	Arg/Arg fator de risco HPV 16
Malisic et al, 2013	Sérvia	PCR-RFLP	123	Casos: biópsia Controle: fresca	Casos: 63,3/34,7/2,0 Controle: 58,1/33,8/8,1 Total: 60,2/34,1/5,7	Arg/Arg fator de risco	-
Yang et al, 2014	China	PCR-RFLP e Sequenciamento	314	-	Casos: 42,1/40,4/17,5 Controle: 31,0/41,0/28,0 Total: 35,0/40,8/24,2	Arg/Arg fator de risco	-
Assoumou et al, 2015	Gabão	PCR alelo específica	102	Casos: FFPE Controle: fresca	Casos: 35,5/51,6/12,9 Controle: 22,5/62,0/15,5 Total: 26,5/58,8/14,7	Sem associação	Sem associação
Brenna et al, 2004	Brasil (SP)	PCR	148	FFPE	Total: 67,0/33,0/0,0	Sem associação	-
Anschau et al, 2005	Brasil (RS)	PCR	155	Fresca	Total: 49,7/40,0/10,3	Sem associação	Sem associação
Estudo	País	Metodologia	n amostral	Tipo amostra	Genótipo <i>TP53</i> % (RR/RP/PP)	Associação com NIC e/ou câncer cervical	Associação com a infecção pelo HPV

Estudo	País	Metodologia	n amostral	Tipo amostra	Genótipo <i>TP53</i> % (RR/RP/PP)	Associação com NIC e/ou câncer cervical	Associação com a infecção pelo HPV
Laprano et al, 2014	Brasil (CE)	PCR-RFLP	133	Sangue periférico	Casos: 44,4/44,4/11,0 Controle: 35,2/51,2/13,6 Total: 38,3/48,9/12,8	Sem associação	-
Chuery et al, 2017	São Paulo Brasil	PCR-RFLP	175	Fresca	Total: 36,6/37,7/25,7	Arg/Arg fator de risco	Arg/Arg fator de risco
Ferreira, 2017	Brasil (MG)	PCR alelo específica	228	FFPE	Arg/Arg e Arg/Pro + Pro/Pro Casos: 55,3/44,7 Controle: 36,0/64,0 Total: 45,6/54,4	Arg/Arg fator de risco	Sem associação

ANEXO 5: Frequências dos genótipos de p53 e n amostral de diferentes estudos no mundo

Estudo	País	n amostral	Genótipo <i>TP53</i> %		
			RR	RP	PP
Van Duin et al, 2000	Holanda	246	53,2	42,3	4,5
Humby et al, 2002	França	138	48,6	50,7	0,7
Abba et al, 2003	Argentina	295	41,3	48,5	10,2
Oliveira et al, 2008	Portugal	575	51,6	48,4	
Klug et al, 2009	Meta-análise: Mundial	15834	45,3	42,8	11,9
Piña-Sánchez et al, 2010	México	237	66,7	27,4	5,9
Meftah et al, 2010	Marrocos	213	17,4	54,0	28,6
Barbisian et al, 2011	Argentina	221	50,2	43,9	5,9
Malisic et al, 2013	Sérvia	123	60,2	34,1	5,7
Yang et al, 2014	China	314	35,0	40,8	24,2

Estudo	País	n amostral	Genótipo <i>TP53</i>%	Estudo	País
Assoumou et al, 2015	Gabão	102	26,5	58,8	14,7
Brenna et al 2004	Brasil (SP)	148	67,0	33,0	0,0
Anschau et al, 2005	Brasil (RS)	155	49,7	40,0	10,3
Laprano et al, 2014	Brasil (CE)	133	38,3	48,9	12,8
Chuary et al, 2017	São Paulo Brasil	175	36,6	37,7	25,7
Ferreira, 2017	Brasil (MG)	228	45,6	39,5	14,9

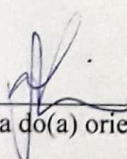


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

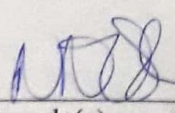
CERTIFICADO DE CORREÇÃO

Certifico que a aluna Maria Clara Batista Costa Ferreira, matrícula 12.1.2168, defendeu o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado *ANÁLISE DO POLIMORFISMO NO CÓDON 72 DO GENE TP53, INFECÇÃO POR HPV E LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS NA CÉRVIX UTERINA*, em 21 de Agosto de 2017 e **REALIZOU TODAS AS CORREÇÕES REQUERIDAS PELA COMISSÃO AVALIADORA.**

Ouro Preto, 29/08/2017



Assinatura do(a) orientador(a)



Assinatura do(a) co-orientador(a).