



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ- UFC
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL - DPML
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

TATIANA DANTAS RODRIGUES LAPRANO

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DE REPARO *APE-1*
(Asp148Glu) E *PARP-1* (Val762Glu) COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL
CERVICAL CAUSADAS PELO PAPILOMAVIRUS HUMANO**

**FORTALEZA-CE
2014**

TATIANA DANTAS RODRIGUES LAPRANO

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DE REPARO *APE-1*
(Asp148Glu) E *PARP-1* (Val762Glu) COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL
CERVICAL CAUSADAS PELO PAPILOMAVIRUS HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientadora:

Profa. Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst.

**FORTALEZA-CE
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L323a Laprano, Tatiana Dantas Rodrigues.
ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DE REPARO APE-1 (Asp148Glu) E PARP-1
(Val762Glu) COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL CAUSADAS PELO
PAPILOMAVIRUS HUMANO / Tatiana Dantas Rodrigues Laprano. – 2014.
88 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2014.

Orientação: Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst.

1. Câncer Cervical. 2. Enzimas de reparo. 3. APE-1 e PARP-1.

CDD 616.9

TATIANA DANTAS RODRIGUES LAPRANO

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DE REPARO *APE-1*
(Asp148Glu) E *PARP-1* (Val762Glu) COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL
CERVICAL CAUSADAS PELO PAPILOMAVIRUS HUMANO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia.

Aprovada em: 09 / 06 / 2014 .

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

Dr. José Eleutério Júnior
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Roberta Barroso Cavalcante
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Aos meus queridos pais, Vicente e Tercia, pelo amor incondicional, apoio e incentivo. Ao meu marido Marcus e meus irmãos Vitor e Tássia, por fazerem parte da minha vida, tornando os meus dias mais divertidos...

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida, por estar ao meu lado em momentos bons e me fortalecer nos difíceis;

Aos meus pais, Vicente e Tercia, pela dedicação aos filhos e pelos ensinamentos, minha eterna gratidão. Vocês são o que tenho de melhor;

Ao meu marido Marcus, por sua colaboração no desenvolvimento deste trabalho, principalmente pelas noites em claro tentando me ajudar, por sua paciência e palavras sábias em meus momentos de angústia. Obrigada por fazer parte da minha vida;

Aos meus amados irmãos Vitor e Tássia, pela presença constante em minha vida, pelos momentos de conversas e brincadeiras, além de me sentir tão amada por vocês;

A minha sogra, Terezinha, por ter sido paciente comigo nos meus momentos de estresses e por sua dedicação à mim.

A minha querida amiga Érika Lemos, pela dedicação ao estudo, por sua disponibilidade em sempre ajudar a todos, pelo apoio que me deste nos momentos difíceis, por todas as disciplinas que passamos juntas e por todas as viagens planejadas com muito carinho;

Aos meus amigos, que compreenderam minha ausência em vários momentos importantes;

Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, representados pelos professores e demais funcionários pelo empenho na formação dos pós-graduandos do curso de mestrado em Microbiologia Médica;

A professora Dra. Silvia Helena Bares Rabenhorst, pela dedicação e orientação no desenvolvimento deste estudo;

Ao CNPq, CAPES e FUNCAP pelo suporte financeiro ao laboratório LABGEM;

Ao Hospital Maternidade Escola Assis Chateaubriand – MEAC, situado em Fortaleza, por permitir o acesso para a execução desse estudo;

Aos participantes da banca, pela presteza em aceitar o convite, pela cuidadosa leitura e pelas valiosas contribuições;

As pacientes, pelo interesse em participar deste estudo;

Ao laboratório de Patologia da Universidade Federal do Ceará - UFC, pelo fornecimento dos resultados dos materiais clínicos oriundos da MEAC;

Aos médicos Dr. José Eleutério Júnior, Dra. Valeria Maria Oliveira Bitu, Dra. Rosinae Alves de Sousa Teles e Dr. Roosevelt pela contribuição no desenvolvimento deste estudo;

A doutoranda Markênia Alves, por sua alegria, pelos excelentes dias em que nos proporciona com sua presença, por sua organização e excepcional dedicação à pesquisa;

A doutoranda Débora Menezes, pela contribuição nas análises estatísticas de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho, além da agradável convivência;

A doutoranda Eliane Pereira, pela convivência no laboratório e por sua dedicação à pesquisa;

A doutoranda Isabelle, que com sua alegria torna os dias mais divertidos no laboratório, principalmente na hora dos cafés;

A mestranda Emanuele, pela convivência no laboratório e por sua dedicação à pesquisa.

As alunas de Iniciação Científica, Lia Pinto e Gedeane Taveira, por colaborar incansavelmente para a realização deste trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular-LABGEM, Ana Paula, Maíra, Josiel, Apollo, Marcus e Morgana pela convivência agradável.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a concretização deste trabalho.

“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma”.

John Ruskin

RESUMO

O alto grau de neoplasia intra-epitelial cervical doença (NIC) é a lesão precursora do câncer do colo do útero, o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres em todo o mundo. Enzimas de reparo são importantes para a integridade genômica e polimorfismo em genes de reparo por excisão de base de DNA (BER) podem ser relevantes para a suscetibilidade de lesões cervicais. Portanto, este estudo teve como objetivo investigar a associação de polimorfismos em genes BER *APE-1* T2197G (Asp148Glu) e *PARP-1* A40676G (Val762Ala) em lesões precursoras do colo do útero, associando com o cigarro, consumação álcool, a idade de início de atividade sexual e número de parceiros sexuais por ano. Materiais e Métodos - Este estudo de caso-controle participaram 203 mulheres. Das quais: 104 pacientes com indicação de biópsia, 75 foram NIC positivos e 29 NIC negativo. Os 99 casos restantes foram considerados grupo controle. Os polimorfismos dos genes de reparo de DNA, *APE-1* T > G e *PARP-1* T > C foi determinada por PCR- RFLP. Resultados - Os pacientes incluídos no estudo tinham idade entre 14-50 anos (média 24 anos). Entre os casos de NIC (+), 66,7 % foram NIC I e 33,3% NIC II / NICIII. Nenhuma associação foi observada para os genótipos de *APE-1*, mas uma baixa frequência do genótipo heterozigoto de *PARP-1* foi associado a NIC I comparado ao grupo controle. Considerando-se os fatores de risco, o genótipo TC de *PARP-1* conferiu proteção para o desenvolvimento NIC, considerando consumação de álcool ($p = 0,038$), a vida sexual início antes dos 18 anos de idade ($p = 0,044$) e 0-1 número de parceiros ($p = 0,001$) para o desenvolvimento NIC, quando comparado com o controle. Além disso, o genótipo TC de *PARP-1* conferiu proteção para o desenvolvimento NIC entre os pacientes que tiveram baixa exposição ao risco e entre os pacientes que começaram a vida sexual antes dos 18 anos de idade quando comparado com o genótipo TT de *PARP-1*. Este último resultado também foi observado quando os NIC (-) foram considerados como controle. No entanto, um risco foi observada entre os pacientes que relataram ter > 1 parceiro sexual/ano. Levando-se em conta a exposição a fatores de risco, tendo como referência a menor exposição, observou-se que o genótipo TT conferia uma proteção para o desenvolvimento NIC em usuários de cigarro ($p = 0,017$; OR= 0,100) e para pacientes que relataram ter > 1 parceiro sexual/ano ($p = 0,000$; OR= 0,063). Considerando-se os subtipos de NIC, uma baixa frequência do genótipo TC foi observada em pacientes NIC I que relataram ter 0-1 parceiro sexual/ano ($p = 0,003$; OR= 0,150) e um risco entre os pacientes que tiveram > 1 parceiro/ano, ($p = 0,015$; OR= 28,000). Conclusão - Estes dados sugerem que a eficácia no reparo do DNA que envolve a *PARP-1* é um balanço entre o genótipo e a exposição do fator de risco, tais como o uso do cigarro e número de parceiros sexuais, em que a eficiência do genótipo heterozigótico para a reparação do DNA está dependente da exposição ao risco. Este estudo adicionou dados para a associação do polimorfismo de *PARP-1* Val762Ala (T40676C) com NIC e foi o primeiro a incluir o *APE-1* Asp148Glu (T2197G) com NIC.

Palavras-chave: Câncer Cervical, APE-1 e PARP-1, Enzimas de reparo.

ABSTRACT

The high-grade cervical intraepithelial neoplasia disease (CIN) is the pre-cursor lesion of cervical cancer, the second most common cancer in women worldwide. Repair enzymes are important for genomic integrity and polymorphism in genes of DNA base excision repair (BER) enzymes can be relevant for cervical lesions susceptibility. Therefore, this study aimed to investigate the association of polymorphisms in BER genes *APE-1* T2197G (Asp148Glu) and *PARP-1* A40676G (Val762Ala) in cervical precursor lesions, associating with tabaco smoking, alcohol consummation, age of beginning sexual activity and number of sexual partners per year. **Materials and Methods** - This case-control study included 203 women. Among the 104 patients with biopsy indication, 75 were CIN positive and 29 CIN negative. The remaining 99 cases were considered control group. The polymorphisms for the DNA repair genes, *APE-1* T > G and *PARP-1* T > C was determined by PCR-RFLP. **Results** - The patients included in the study were aged 14-50 years (median 24 years). Among the CIN (+) cases, 66.7% were CIN II/CIN III and 33.3% were CIN I. No association was observed for *APE-1* genotypes, but a statically low frequency of *PARP-1* heterozygous genotype was associated to CIN I compared to the control group. Considering the risk factors, the *PARP-1* TC genotype conferred a protection for CIN development, considering alcohol consummation ($p = 0.038$), onset sexual life before 18 years old ($p = 0.044$) and 0-1 number of partners ($p = 0.001$) for CIN development when compared control with CIN (+). Besides, the *PARP-1* TC genotype conferred a protection for CIN development among patients who had low exposure to risk and among patients who beginning sexual life before 18 years old when compared to *PARP-1* TT genotype. This last result were also observed when CIN (-) were considered as control, however, a risk was observed among the patients who reported having more than >1 sexual partner/year. Taking in account the risk factors exposure, having as reference the less exposure, it was observed that the TT genotype give a protection for CIN development for tobacco users ($p = 0.017$; OR = 0.100) and for patients who reported having more than one sexual partner ($p = 0.000$; OR=0.063). Considering the CIN subtypes, low frequency of TC genotype was observed in CIN I patients among the patients who have 0-1 sexual partner/year ($p = 0.003$; OR = 0.150) and a risk among patients who had >1 partner/year, ($p = 0.015$; OR = 28.000). **Conclusion** - This data suggest that the efficiency of the DNA repair involving *PARP-1* is a balance between genotype and exposure of the risk factor as smoking and number of partner, where the efficiency of the heterozygous genotype for DNA repair is dependent of the risk exposure. This study add data for the association for *PARP-1* Val762Ala (T40676C) polymorphism and CIN and was the first to include the *APE-1* Asp148Glu (T2197G) genotype and CIN.

Keywords: Cervical Cancer, APE-1 and PARP-1, Repair Enzymes.

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura do Papilomavírus Humano.....	18
Figura 2 - Representação esquemática do genoma do HPV.....	19
Figura 3 - Relação evolutiva entre Papilomavírus humano	20
Figura 4 - A modulação das moléculas do ciclo celular por oncoproteínas do HPV	23
Figura 5 - Ciclo biológico do HPV.....	25
Figura 6 - Infecção pelo HPV na progressão da lesão cervical.....	28
Figura 7 - Mortalidade por câncer do colo do útero no mundo	29
Figura 8 - Diferenças regionais da mortalidade por câncer do colo do útero no Brasil em 2011.....	30
Figura 9 - Anatomia do útero	31
Figura 10 - Imagem do colo do útero saudável (A) e com lesão (B)	32
Figura 11 - Esquema representativo da APE-1 no reparo no DNA.....	36
Figura 12 - Esquema representativo do papel da PARP1 no reparo por excisão de base (BER).....	38

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Taxas de incidência estimados por região para 2014.....30

Tabela 2 - Classificação das lesões pré-cancerosas do colo uterino.....33

Lista de Abreviaturas

HPV	Papilomavírus Humano
PV	Papilomavírus
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IARC	Agência Internacional para pesquisa do Câncer
EUA	Estados Unidos da América
LSIL	Lesão Intraepitelial de Baixo Grau
HSIL	Lesão Intraepitelial de Alto Grau
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
ASC-US	Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado
ASC-H	Células Escamosas Atípicas não podendo excluir Lesão Intraepitelial de Alto Grau
JEC	Junção Escamocolunar
RNA	Ácido Ribonucléico
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
URR	Região Regulatória Inicial
LCR	Região de Controle Longo
ORI	Origem de Replicação
ORF	Quadro de Leitura Aberto
MDM2	Mouse Double Minute 2
ARF	Quadro de Leitura Alternativa
LOH	Perda de heterozigosidade
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único

PCR	Reação de Cadeia de Polimerase
RFLP	Polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição
Da	Dalton
Glu	Ácido Glutâmico
8-oxo-G	8-oxo-7,8-diidroguanina. (Produto da oxidação da guanina)
aa	Aminoácidos
Ala	Ácido Alanina
AP	apurínicos/apirimidínicos
APE-1	Endonuclease apurínica/apirimidínica-1
Asp	Ácido Aspártico
BER	Reparo por excisão de bases
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos
OGG-1	8-oxoguanina DNA glicosilase
PARP-1	Poli (ADP-Ribose) Polimerase-1
ROS	Espécies reativas do oxigênio
Val	Ácido Valina
WHO	Organização Mundial de Saúde
NCBI	Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1. Papilomavírus humano (HPV).....	16
1.1.1. Histórico.....	16
1.1.2. Características e Classificação	17
1.1.3. Papel das proteínas	21
1.1.4. Ciclo biológico.....	25
1.2. Câncer de Colo Uterino	28
1.2.1. Epidemiologia	28
1.2.2. Características Clínicas e Histopatológicas	31
1.2.3. Etiologia	34
1.3. Genes de reparo no DNA.....	35
1.4. Polimorfismos genéticos em genes de reparo e sua relação no Câncer de Colo Uterino	39
1.5. Pergunta de partida.....	40
1.6. Hipótese de Trabalho.....	40
2. Objetivos.....	41
2.1. Objetivo geral	41
2.2. Objetivo específico.....	41
3. Referências bibliográficas.....	42
4. Apêndices.....	52
Apêndices - I Artigo	52
Apêndices - II Tabelas Complementares.....	69
Apêndices - III Artigo	78
Apêndices - IV Questionário Clínico Sócio-epidemiológico.....	84
Apêndices - V Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	85
5. Anexo	88
Anexo - I Parecer do Comitê de Ética	88

1. INTRODUÇÃO

1.1. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

1.1.1. HISTÓRICO

O conhecimento sobre os Papilomavírus Humano (HPVs) e seus aspectos têm sido evidenciados através de décadas de muitas pesquisas. O médico italiano Rigoni-Stern, provavelmente foi o primeiro a sugerir que os contatos sexuais poderiam contribuir no desenvolvimento do câncer de colo uterino, após examinar os registros da cidade de Verona, entre 1760-1839, observando uma elevada frequência deste câncer entre prostitutas, mulheres casadas, mulheres viúvas e raramente entre virgens e freiras (RIGONI-STERM, 1842).

No final do século XIX, vários trabalhos confirmaram o resultado de Rigoni-Stern, no entanto somente em 1907 foi demonstrada a etiologia viral através de um inóculo contendo um filtrado celular com verruga comum, confirmando a transferência da infecção (CIUFFO, 1907). Desde então, a nomenclatura etiológica viral passou a ser vírus da verruga humana (do inglês, Human wart virus). Durante algumas décadas, acreditava-se que todas as diferentes manifestações de verrugas e papilomas eram causadas por um único tipo de vírus (SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 2008; ZUR HAUSEN, 2009).

Diversos trabalhos foram publicados durante este período de compreensão da forma clínica da doença, sendo possíveis alguns avanços importantes, dentre eles, a associação do HPV com o câncer de colo uterino que iniciou-se a partir de 1928, quando o médico patologista George Papanicolaou introduziu o diagnóstico citológico para esse tipo de câncer, com base na modificação pré-maligna do colo uterino. (PAPANICOLAOU & TRAUT, 1941).

Strauss e colaboradores em 1949, demonstraram com o auxílio da microscopia eletrônica a presença das partículas virais em amostras de verrugas cutâneas e somente em 1969 por Almeida e colaboradores em amostras de verrugas genitais. Ainda em 1949, Ayres e colaboradores identificaram a presença de halos em células de esfregaços de papanicolaou e em biópsia cervical. Contudo, somente após cinco anos, Koss e Durfee confirmaram os achados prévios, identificando as alterações nas células como “atípias colilocitóticas” (SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 2008).

As pesquisas na área molecular aconteceram a partir de 1965, quando foram obtidos os primeiros relatórios caracterizando a dupla cadeia circular do HPV por Crawford (1965) e Klug e Finch (1965). Posteriormente, Rowson e Mahy (1967) descreveram as várias formas das verrugas e dos papilomas provocados pelo vírus da verruga humana (SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 2008; ZUR HAUSEN, 2009).

Todavia, o primeiro indício da heterogeneidade da família de HPVs surgiu em pesquisas utilizando-se hibridização, realizadas na Alemanha pelo infectologista Dr. Harald Zur Hausen (ZUR HAUSEN et al., 1974). Somente após dois anos, Zur Hausen conseguiu formular suas hipóteses sobre o HPV como agente etiológico do câncer de colo uterino e contou com a colaboração do grupo Gerard Orth, em Paris, para estabelecer a pluralidade do vírus, sendo nesse momento revelado os primeiros tipos de HPVs em verrugas cutâneas (ZUR HAUSEN, 2009).

Na década de 80 ficou bem estabelecida a heterogeneidade do Papilomavírus Humano e sua associação com o câncer de colo uterino. Estudos epidemiológicos e moleculares confirmaram a infecção do colo uterino, por diferentes tipos de HPVs (ZUR HAUSEN, 2009; LETO et al., 2011).

Os avanços nas pesquisas moleculares dos HPVs têm revolucionado no rastreamento, diagnóstico e tratamento das doenças relacionadas, demonstrando como a tecnologia pode ser uma grande aliada na prevenção dessas doenças que são consideradas problemas mundial de saúde.

1.1.2. CARACTERÍSTICAS E CLASSIFICAÇÃO

Os HPVs são caracterizados como vírus icosaédricos, não envelopados, possuindo diâmetro de 50 a 60nm. São compostos por um capsídeo formado por 72 capsômeros pentaméricos (figura 1) e o seu genoma é constituído de uma dupla hélice de DNA circular com aproximadamente oito mil pares de bases (HOWLEY & LOWY, 2001; SILVA et al., 2002; ROSA et al., 2009).

Os Papilomavírus (PVs) estão incluídos na família Papillomaviridae. Esses vírus infectam células epiteliais e têm a capacidade de causar lesões na pele e em mucosas, causando diversos tipos de lesões como a verruga comum e verruga genital. Os vírus possuem crescimento limitado e frequentemente a infecção regride espontaneamente (SAAVEDRA et al., 2012).

FIGURA 1. Estrutura do Papilomavírus Humano.

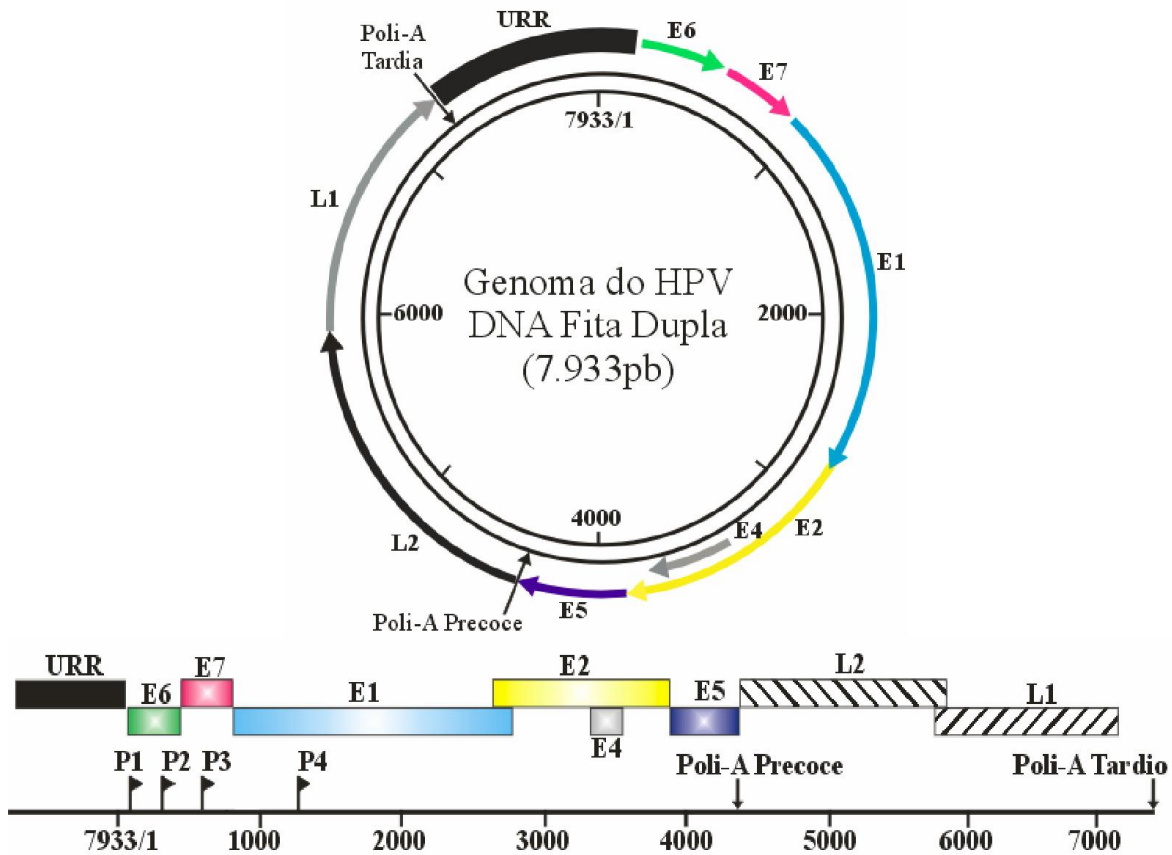


Fonte: <http://theyee.ca/News/2007/05/31/HPVVax/>.

O DNA circular do vírus pode ser dividido em três regiões: 1-) Região URR (do inglês, Upstream Regulatory Region), conhecida também como LCR (do inglês, Long Control Region), sendo essa a região não codificadora do genoma viral que desempenha funções regulatórias, contém a origem da replicação (ORI), promotores precoces com sítios de ligação para fatores de transcrição e proteínas reguladoras. 2-) A região precoce (do inglês, early region) contém seis ORFs (do inglês, Open Reading Frame), E1, E2, E4, E5, E6 e E7 envolvidos na transativação gênica, replicação, transformação e adaptação viral a diversos ambientes celulares. 3-) A região tardia (do inglês, late region) que contém dois ORFs codificadores das proteínas tardias L1 e L2 responsáveis pela formação do capsídeo (figura 2). As regiões precoces e tardias são imediatamente seguidas por sequências poli-A (SOUTO et al., 2005; BRINGHENTI et al., 2010; GARCÍA-TAMAYO et al., 2010).

Diferente de outros vírus, somente uma das fitas do DNA viral apresenta ORFs, de forma que, a transcrição ocorre apenas num sentido. Acerca dos promotores precoces, o genoma viral pode apresentar até quatro deles (P1, P2, P3, P4), no entanto para os genótipos do HPV existem pelo menos dois promotores principais: P1 (ou P97) localizado no gene E6 e o P2 (ou P670) localizado no gene E7 (CHOW et al., 2010). Outra característica que esses vírus possuem são os *splicing* alternativos (PIM e BANKS, 2010).

FIGURA 2. Representação esquemática do genoma do HPV.

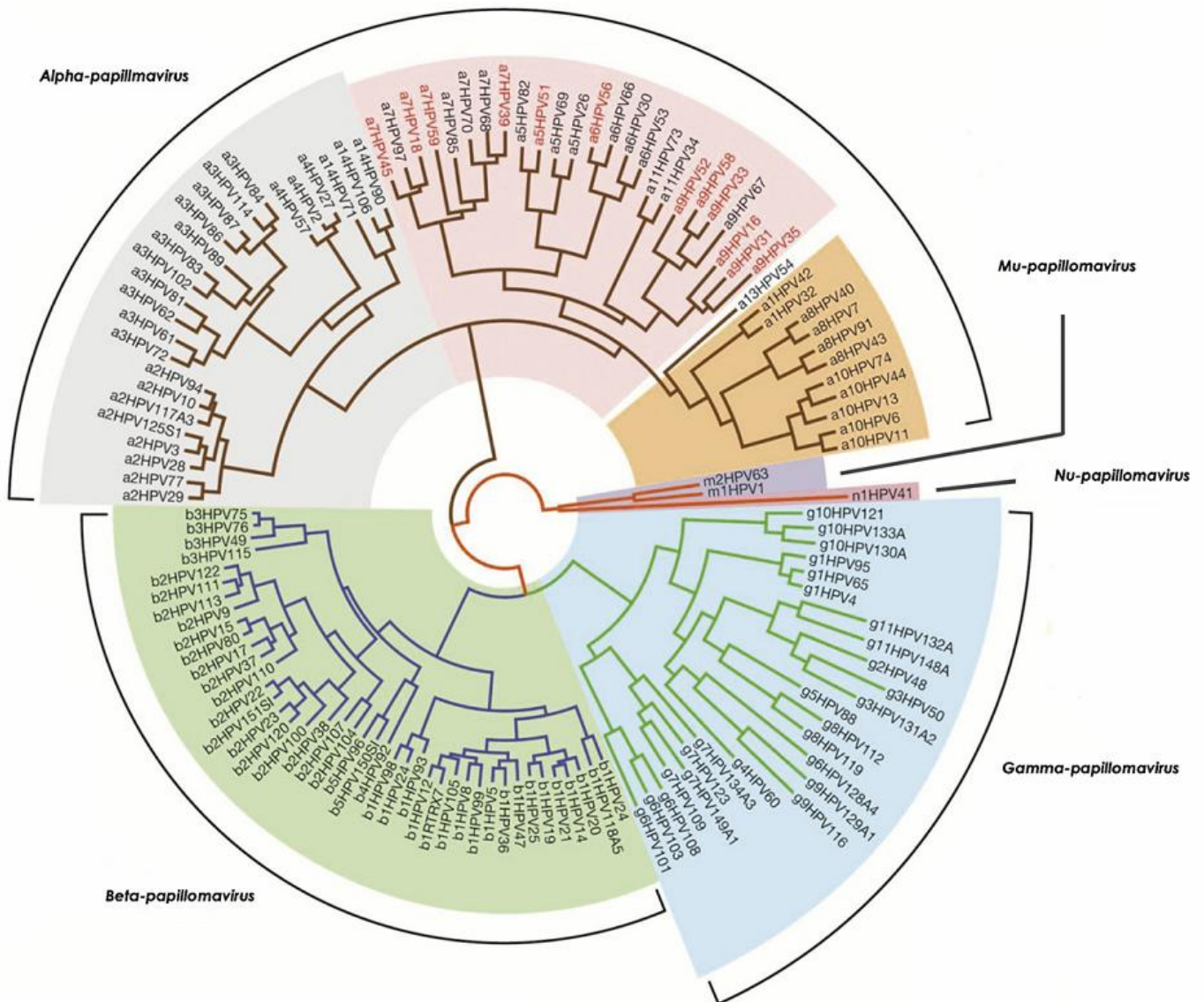


Adaptado de Chow, Broker e Steinberg (2010); Burk, Chen e Van Doorslaer (2009). O genoma contém uma região não codificadora reguladora (URR), uma região precoce (E) e uma região tardia (L). Existe também a presença de três promotores principais (P1, P2, P3), um promotor menor (P4), e dois poli-A. O splicing alternativo dos transcritos primários de RNA, juntamente com a utilização de promotores alternativos e poli-A, permite a tradução de proteínas virais com o primeiro ou o segundo ORF nos mRNAs. Esta organização genômica é altamente conservada, exceto para a ausência do P2 em genótipos do HPV de alto risco.

Os HPVs são classificados de acordo com o tipo viral, subtipos e variantes do mesmo tipo e essa diferenciação se deve à semelhança na sequência de seus nucleotídeos. Contudo, essa classificação só foi possível devido ao aperfeiçoamento das técnicas moleculares. Com esses métodos pode-se entender a identificação de um tipo novo de HPV, o qual é definido quando a sequência de DNA do quadro de leitura aberta L1 ou ORF L1, diferir mais de 10% da sequência do HPV filogeneticamente mais próximo, diferenças entre 2% a 10% definem seus subtipos e diferenças menores que 2% definem as variantes. Dentre todos os genes, a região do ORF L1 é o mais conservado do genoma dos HPVs (DE VILLIERS et al., 2004; INCA, 2011).

Atualmente os PVs são descritos em 16 gêneros, sendo estes designados pelas letras do alfabeto grego (Alfa, Beta, Gama, Delta, Epsilon, Zeta, Eta, Theta, Iota, Kappa, Lambda, Mu, Nu, Xi, Omikron, Pi). Contudo, os Papilomavírus humano têm sido descritos em cinco gêneros (Alfa-, Beta-, Gama-, Mu- e Nu-papilomavírus), possuindo mais de 150 genótipos classificados conforme apresentado na figura 3 (KOVANDA et al., 2011; DOORBAR et al., 2012; FREITAS et al., 2012).

FIGURA 3. Relação evolutiva entre Papilomavírus Humano.



Adaptado de Doorbar et al. (2012); <http://pave.niaid.nih.gov/#home>; Bernard et al. (2010). Os papilomavírus Alpha incluem os HPV de mucosas de baixo risco (muitos dos que estão dentro do ramo laranja sombreada) e os de alto risco (contida no ramo com destaque sombreado rosa). Os tipos de HPV cutâneas (a maioria dos quais estão contidos dentro do cinza (Alpha), verde (Beta) e azul (Gama) ramos sombreadas) geralmente não são associados com câncer. A imagem mostra a árvore filogenética mais conhecida de 132 tipos de HPV.

Sabe-se que o maior grupo com espécies de HPVs pertence à família dos Alfapapilomavírus. Dentre as espécies encontram-se os HPVs de alto risco, tais como 16 e 18 que são considerados os responsáveis pelo desenvolvimento de câncer do colo uterino, além desses os HPVs 6 e 11 que são classificados como baixo risco (DE VILLIERS et al., 2004; KOVANDA et al., 2011; DOORBAR et al., 2012).

Os Betapapilomavírus possuem cinco diferentes espécies. Os HPVs 5 e 8, pertencentes à espécie 1 deste gênero, são mais comumente identificados na pele de indivíduos com epidermodisplasia verruciforme (EV) (DE VILLIERS et al., 2004; BERNARD HANS-ULRICH, 2005; KOVANDA et al., 2011).

Os Gamapapilomavírus abrangem cinco espécies diversas com sete tipos de HPVs diferentes que causam lesões cutâneas: HPVs 4, 48, 50, 60, 88, 65 e 95. Os Mupapilomavírus contém em seu grupo os HPVs 1 e 63. O Nupapilomavírus é o último grupo que possui apenas uma espécie, HPV 41, que causa lesões cutâneas benignas (DE VILLIERS et al., 2004; DOORBAR JOHN, 2006; KOVANDA et al., 2011).

1.1.3. PAPEL DAS PROTEÍNAS

A integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro necessita além de sinais celulares, de agentes ligantes e de receptores membranares que iniciem a ativação de uma cascata de eventos controladora do ciclo celular. Os genes, da região precoce e da região tardia do HPV possuem grande importância nesse processo, sendo cada gene responsável por produzir proteínas com funções específicas para transformar e immortalizar a célula lesada (SILVA et al., 2002; SICHERO et al., 2012).

As E1, E2, E4, E5, E6 e E7, são as proteínas precoces do HPV. O papel da E1 e da E2 na amplificação do genoma viral está bem estabelecido. Durante a infecção natural, E1 é expressa em níveis muito baixos e requer a presença de E2, para ser eficientemente orientada para os seus locais de ligação. E1/E2 se associam, principalmente, através de sua extremidade N-terminal e liga-se ao DNA como um dímero através de sua extremidade C-terminal (DOORBAR JOHN, 2006).

A proteína E1 se liga a complexos de ciclina/CDK, resultando na fosforilação da proteína viral, necessária para a localização nuclear da mesma. A E1 é expressa ao longo de todo período de infecção dos HPVs, porém, os níveis mais elevados são constatados na fase vegetativa quando o promotor tardio está ativo (HEBNER & LAIMINS, 2006).

Além de participar da amplificação do genoma viral e do controle da replicação, a E2 também está envolvida na regulação da transcrição de genes virais, como a E6 e E7, através da ligação ao sítio E2BS (do inglês, E2-binding site) localizado na URR. A transcrição viral é ativa em baixos níveis de E2, por outro lado, em altos níveis a transcrição é reprimida (HEBNER e LAIMINS, 2006).

A proteína E4 (E1^{E4}) é a proteína mais expressa e ocorre ao longo de todo ciclo viral. O transcrito inclui os cinco primeiros resíduos de aminoácidos da E1 integrados ao ORF E4 por meio de *splicing*, por isso a denominação E1^{E4} (HEBNER & LAIMINS, 2006). Um dos efeitos constatados é a capacidade da E4 de ligar-ser à citoqueratinas através de resíduos de leucina (LLXLL) na porção N-terminal (ROBERTS et al., 1994). Este evento tem sido associado na liberação do vírus (CHOW et al., 2010).

A proteína E5 do HPV possui localização membranar, constituída aproximadamente por 83 aminoácidos, sendo encontrada predominantemente no retículo endoplasmático, onde interage com um próton-ATPase vacuolar, bloqueando a acidificação de endossomos precoces resultando na alteração da transdução de sinais do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e receptores tirosino-quinases relacionados na participação da regulação do crescimento celular, contribuindo para a proliferação celular (Figura 4) (KIVI et al., 2008; FREITAS et al., 2013). A E5 não é expressa em cânceres HPV-positivos, devendo contribuir apenas para as etapas iniciais da carcinogênese, devido a sua expressão em Neoplasia Intraepitelial Cervical (NICs) (CAMARA et al., 2008). Apesar das propriedades conhecidas, o papel desta proteína no ciclo de vida dos HPVs ainda não está claro (CHOW et al., 2010).

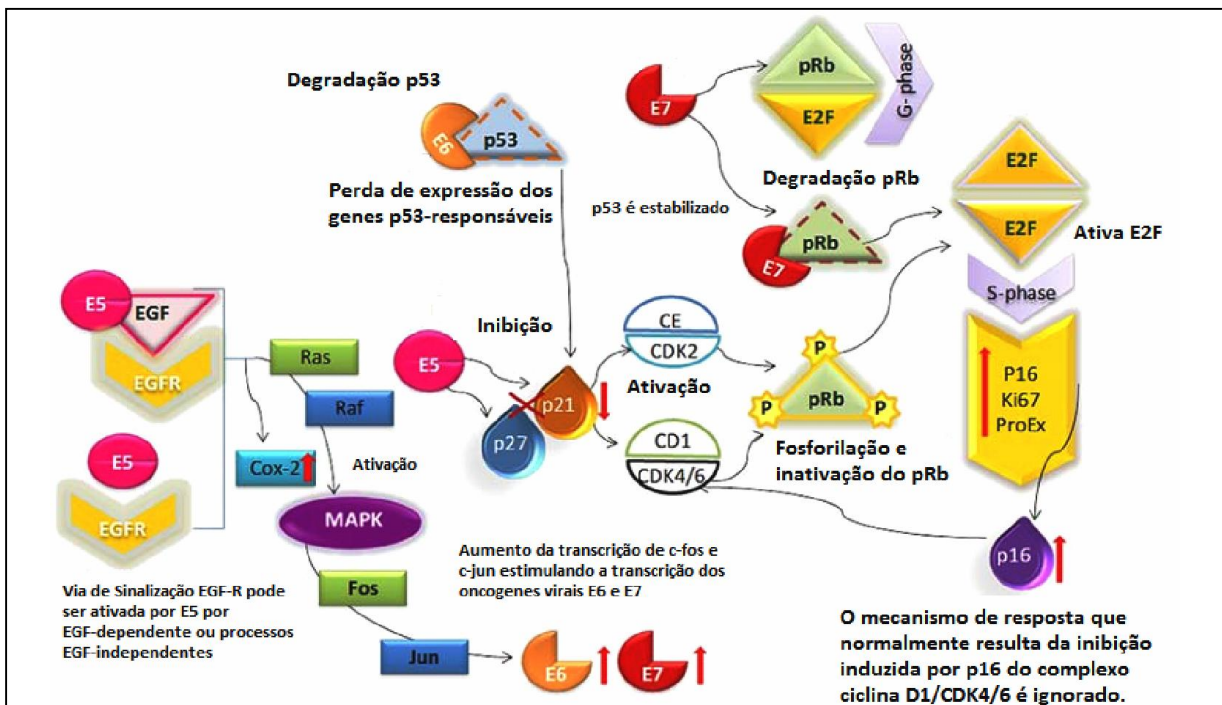
A proteína E6 é uma oncoproteína, constituída de 151 aminoácidos, que ao se ligar a proteína p53 faz com que essa reprima sua atividade de supressor tumoral. O mecanismo envolvido neste processo se dá através da proteína viral E6, que recruta a proteína celular E6AP que funciona como uma ubiquitina-ligase para o complexo contendo p53 e este recrutamento resulta na rápida degradação da p53 (figura 4) (SILVA et al., 2002; ROSA et al., 2009; FREITAS et al., 2013). A indução da degradação da p53 parece ser uma propriedade exclusiva da proteína E6 dos HPVs de alto risco (GHITTONI et al., 2010). A E6 induz também de forma independente, a atividade da telomerase, ativando o promotor da telomerase transcriptase reversa. A imortalização das células que ocorre quando existe a ativação da telomerase é mais um

importante fator no desenvolvimento de tumores malignos, incluindo o câncer de colo uterino (ROSA et al., 2009).

A oncoproteína viral E7 atua como um importante fator de progressão tumoral. É uma proteína nuclear, que contém aproximadamente 100 aminoácidos e sua atividade inicial acontece com a associação do gene do retinoblastoma (*RB*). O *RB* é um gene supressor tumoral importante no controle do ciclo celular, pois promove a transcrição da fase G1 a S (figura 4) (SILVA et al., 2002; GHITTONI et al., 2010).

Sob regulação do ciclo celular normal, a proteína Rb é fosforilada durante a fase S, mediada por quinase dependente de ciclina (CDK). A Rb se liga ao fator de transcrição E2F reprimindo a transcrição de genes necessários à síntese de DNA, os quais são transcritos de maneira dependente do ciclo celular e diretamente regulado pelos E2F (RAPAPORT et al., 2005). Dessa forma, na presença das proteínas virais, a Rb fosforilada é impedida pela proteína E7 de se ligar a E2F, permitindo assim que o fator de transcrição promova a continuidade do ciclo celular de células epiteliais já diferenciadas, favorecendo a replicação de genes do HPV (MCMURRAY et al., 2001; FREITAS et al., 2013).

FIGURA 4. A modulação das moléculas do ciclo celular por oncoproteínas do HPV.



Adaptado de Freitas et al. (2013); Hwang & Shroyer. (2012). A oncoproteína E7 do HPV liga-se a pRb e provoca a sua degradação, levando à deslocação de E2F ativo. Portanto, a ativação dos genes em fase S (p16, Ki67, ProEx) em ambas camadas basal e parabasal de células. A oncoproteína E6 de HPV liga-se a

p53 e orienta a sua degradação que resulta na perda de expressão de genes p53-respondedores (p21) e E5 do HPV ativa a via de sinalização por meio de processos da EGF-dependentes ou independentes de EGF (Fatores de crescimento epidérmico).

Estudos mostram que a atuação da proteína E7 do HPV de alto risco tem a capacidade dez vezes maior de se ligar ao Rb do que as proteínas E7 de baixo-risco, mostrando assim, diferenças na eficiência de ligação ao sitio de Rb (RAPAPORT et al., 2005).

A maioria dos autores concordam que os efeitos da E6 e da E7 sobre os dois principais supressores tumorais, p53 e pRb respectivamente, são responsáveis pelo potencial oncogênico do HPV, pois a expressão de E7 na ausência de E6 resulta num aumento do nível de p53, provavelmente decorrente da ativação do p19^{ARF} induzido pelo E2F. Portanto, a oncoproteína E6 é indispensável para evitar os estímulos de parada do ciclo celular ou apoptótico advindos da p53 (HOWLEY e LOWY, 2001; PIM & BANKS, 2010; SAAVEDRA et al., 2012).

Existem ainda outras duas proteínas, conhecidas como proteínas tardias L1 e L2. A proteína L1 é composta por duas regiões (N- e C- terminal) que são descritas como "braços invasores" que formam alicerce entre os capsídeo menor L2 (WOLF et al., 2010; BUCK et al., 2013). Cada "braços invasores" da região C- terminal ligam-se aos capsômeros vizinhos através das ligações de pontes de dissulfeto interL1. Estudos utilizando vetores de papilomavírus mostram que os capsídeo imaturos que ainda não formaram pontes dissulfeto, mesmo sendo infecciosos, são fisicamente frágil. Assim, estas ligações dissulfeto parecem ser essenciais para a estabilidade do vírus (BUCK et al., 2013).

As proteínas tardias do HPV são compostas pela interação da L1 e L2. O vírion do papilomavírus podem acomodar até 72 moléculas do capsídeo L2. Contudo, a expressão da L2 é apenas na superfície do vírus maduro, sendo apenas transitória nos vírus imaturos (RICHARDS et al., 2006; DAY et al., 2008). A expressão destas duas classes de proteínas é altamente regulada e está associada à diferenciação de células epiteliais infectadas pelo HPV (BRAGAGNOLO et al., 2010).

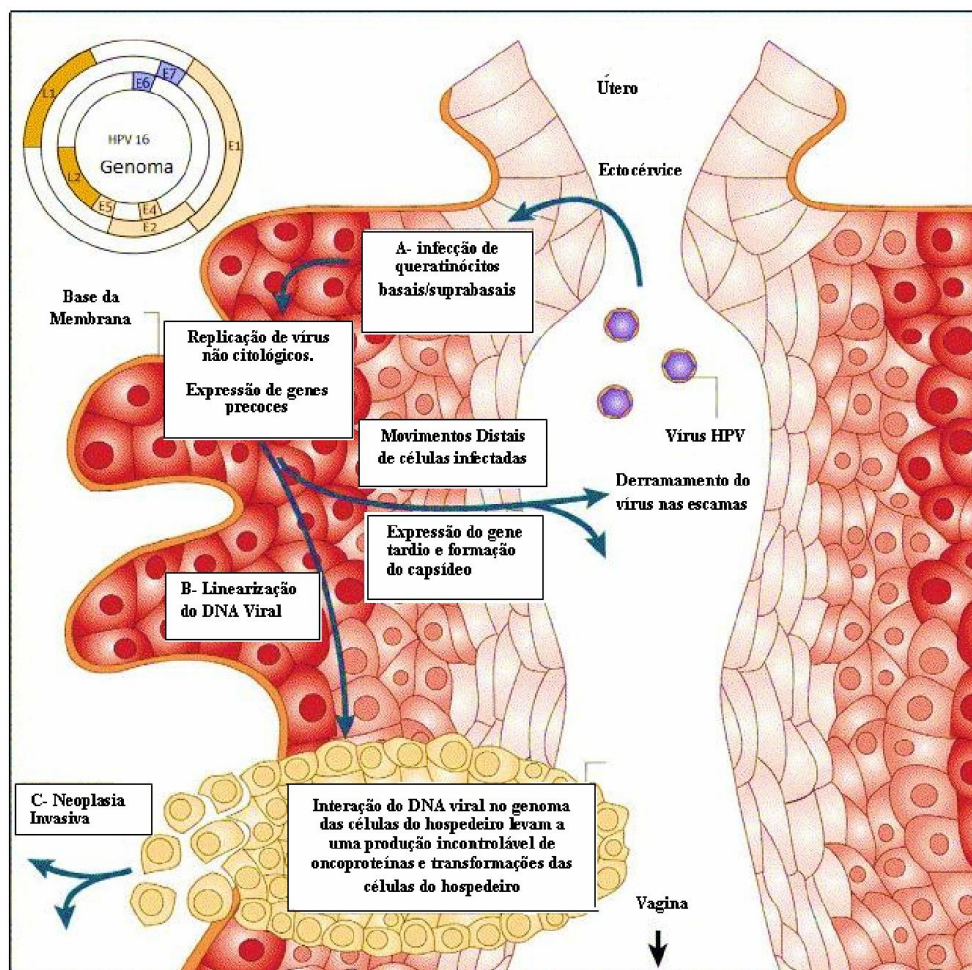
A região tardia L1 ORF é a mais conservada dentre as proteínas dos HPVs e o seu produto representa 80% das proteínas do capsídeo viral constituindo a proteína mais abundante e de alta imunogenicidade. A proteína L2 com a L1 contribui para a incorporação do DNA viral dentro do vírion (LETO et al., 2011).

1.1.4. CICLO BIOLÓGICO

As funções vegetativas virais, síntese do DNA e de proteínas do capsídeo bem como a montagem dos novos vírus, ocorrem exclusivamente nos queratinócitos diferenciados (SOUTO et al., 2005; CAMARA et al., 2008).

O início do ciclo biológico acontece após as partículas virais penetrarem nas células da camada epitelial (figura 5), o que ocorre devido às lesões ou micro-lacerações. A progressão da incubação viral para a expressão ativa depende de três fatores: permissividade celular, tipo de vírus e condição imunológica do hospedeiro. O tempo de incubação viral pode ser de quatro a seis semanas, meses ou até anos para provocar o surgimento de lesões (SOUTO et al., 2005; CASTRO et al., 2006; DOORBAR et al., 2012).

FIGURA 5. Ciclo biológico do HPV.



Adaptado de Abu et al. (2005).

Apesar de muitos estudos sobre esse assunto, ainda não está claro quais receptores da superfície celular estão envolvidos na ligação e entrada destes vírus nas células hospedeiras. O que se sabe, é que ocorre uma interação das proteínas do capsídeo com tais receptores, principalmente devido às interações de L1 com sulfato de heparano (HS) exibidas em proteoglicanos (JOHNSON et al., 2009; FREITAS et al., 2012; BUCK et al., 2013). Estudos *in vivo* demonstraram que a interação do HS proteoglicanos (HSPG) ocorre na membrana basal extracelular, enquanto *in vitro* os PVs interagem com HSPG na superfície da célula e em menor grau na matriz extracelular (SELINKA et al., 2007). No entanto os capsídeos L1/L2 não interagem diretamente com as superfícies das células de queratinócitos *in vivo* (KINES et al., 2009). Sendo relatado como receptor celular secundário para os papilomavírus a α -seis integrina, devido a expressão desta integrina em queratinócitos basais e sua associação com HSPG (ABBAN & MENESES, 2010; FERRARO et al., 2011). Contudo, Huang e Lambert, (2012) demonstraram que esta integrina não é essencial para infecção *in vivo*. Sendo necessário mais estudos para entender essa relação.

A infecção pelo HPV pode ser dividida em duas fases: precoce e tardia. A fase precoce acontece quando o vírus permanece nas células basais, em que a replicação viral acompanha a divisão celular, sendo regulada por fatores do hospedeiro e por proteínas precoces virais. Posteriormente, as células-filhas oriundas da divisão de células basais e parabasais vão progredindo para camadas mais superiores do epitélio cessando a divisão. A diferenciação celular ocorre com a produção concomitante de queratinas de elevado peso molecular, ocorrendo uma parada fisiológica do ciclo celular nestas células diferenciadas através da ação de proteínas virais (principalmente da E6 e E7), as quais permitem a replicação vegetativa do genoma viral e a transcrição dos genes estruturais L1 e L2. Tal fenômeno é típico da fase tardia, sendo então liberadas na camada mais superior do epitélio após o empacotamento do DNA viral (HEBNER & LAIMINS, 2006).

Após a infecção viral, os genes E1 e E2 agem independentes dos sítios de ligação na origem de replicação (URR) do papilomavírus. Porém, poderá ocorrer a interação das proteínas E1-E2 formando um complexo multimérico que auxiliará a replicação viral, recrutando proteínas que participam da replicação do DNA, regulação e expressão do genoma, sendo também responsáveis por manter o DNA viral na forma episomal e por iniciar a replicação do episoma (FERRARO et al., 2011).

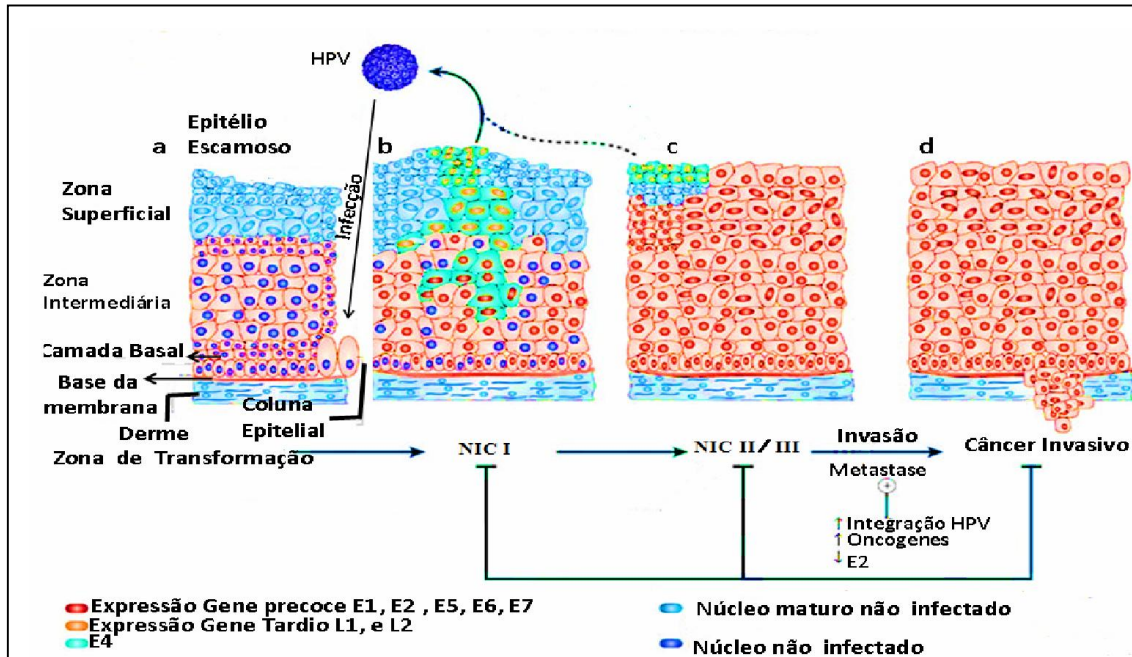
Estudos de transcrição viral em linhagens de queratinócitos humanos, imortalizados por HPV-16 proposto por Doorbar (1990) e Rohls (1991), mostraram que os genes precoces são transcritos a partir de promotores (P1, P2, P3, P4) através de splicing alternativo, gerando vários RNAs. As proteínas traduzidas a partir desses RNAs mensageiros vão interferir na função de proteínas celulares que controlam o ciclo normal da célula, a diferenciação celular e a apoptose (CHOW et al., 2010).

Nos HPVs, a ação das oncoproteínas E6 para a degradação de p53 e da E7 para o bloqueio da Rb são mais eficientes nos de alto risco. No estágio produtivo do ciclo viral, a expressão de E7 parece reativar o mecanismo celular de replicação de DNA para que ocorra a amplificação do genoma viral para a produção de novos vírions (FLORES et al., 2000; PIM & BANKS, 2010).

As proteínas L1 e L2 depois de sintetizadas no citoplasma são direcionadas ao núcleo da célula para a montagem de novas partículas virais (VILLA, 1997) nas camadas mais superficiais do epitélio, sendo então liberado as partículas virais na superfície da lesão durante a descamação celular, sem lisar a célula do hospedeiro (DOORBAR JOHN, 2005).

Após a liberação do vírus na superfície do epitélio, irá continuar ocorrendo a proliferação das células infectadas que já não são mais restritas às camadas inferiores do epitélio, passando a progredir para as demais camadas do tecido contribuindo para o surgimento das lesões precursoras da neoplasia cervical, conhecidas também por neoplasia intraepitelial cervical (NIC) que possuem três estágios diferenciados conforme o grau de gravidade (NIC I, NIC II e NIC III), estando estes diretamente relacionados à proporção em que o epitélio escamoso é substituído por células atípicas (figura 6) (SANTANA et al., 2008).

FIGURA 6. Infecção pelo HPV na progressão da lesão cervical.



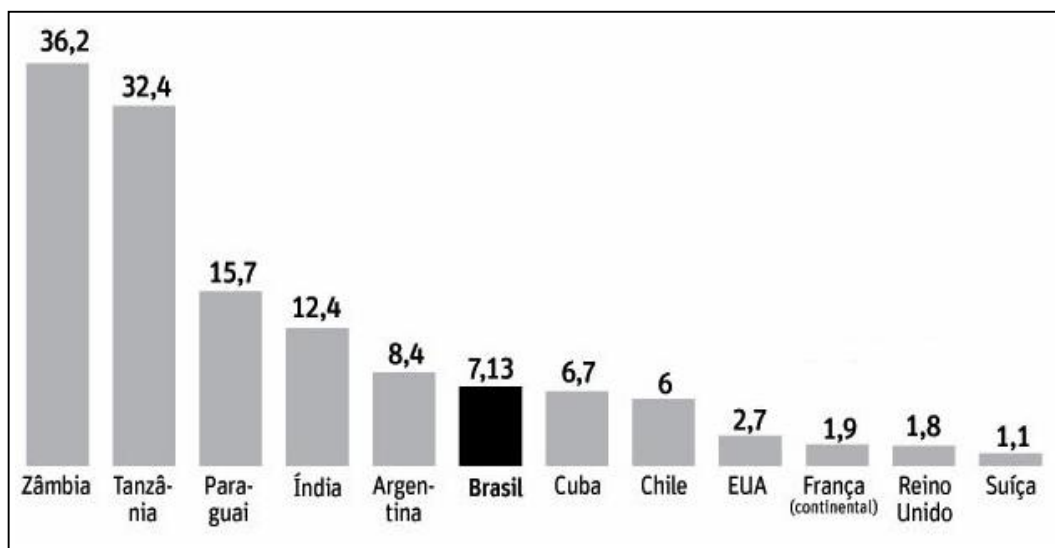
Adaptado de Roden e Wu (2006). **a.** Início da infecção pelo vírus. **b.** Infecção intra-epitelial de baixo grau, que após a infecção pelo HPV nos queratinócitos basais, expressão (núcleo vermelho) dos genes E1, E2, E5, E6 e E7. Já nas camadas superiores do epitélio, o genoma viral é replicado e E4 (verde citoplasma), L1 e L2 (laranja núcleos) são expressos. **c.** Infecção com progressão para lesão intraepitelial de alto grau. **d.** Sem o devido tratamento a lesão progride para carcinoma in situ.

1.2. CÂNCER DE COLO UTERINO

1.2.1. EPIDEMIOLOGIA

O câncer de colo uterino no mundo é considerado o segundo tipo de câncer mais incidente na população feminina, com aproximadamente 530 mil novos casos por ano, sendo responsável por aproximadamente 275 mil óbitos/ano (figura 7). Esse câncer já é considerado um dos mais importantes e danosos cânceres da mulher (IARC, 2013; WHO, 2013).

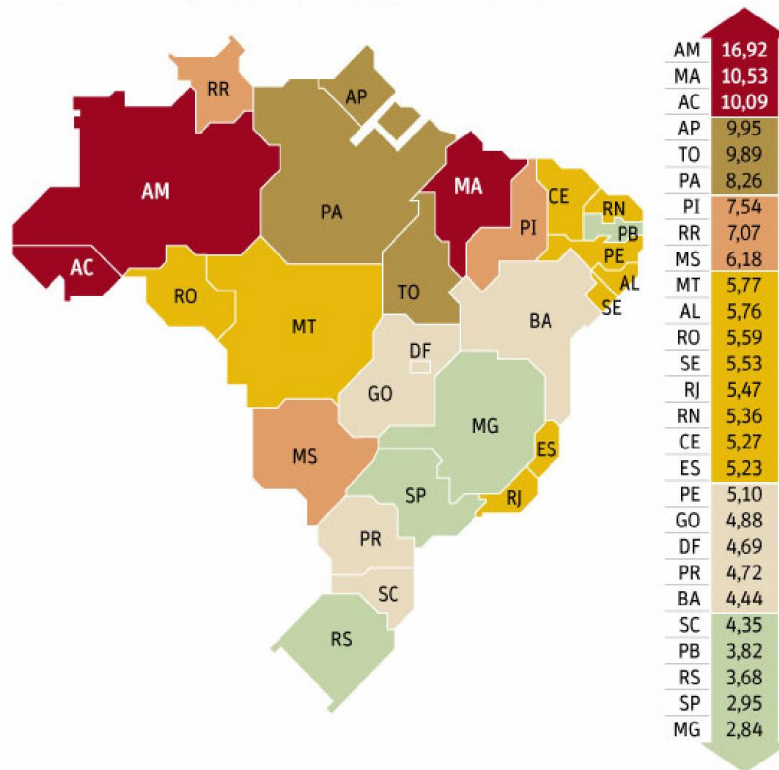
FIGURA 7. Mortalidade por câncer do colo do útero no mundo.



Adaptado de INCA, GLOBOCAN 2012 e IARC/OMS. <http://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/2014/01/1393209-cancer-do-colo-do-utero-mata-no-norte-do-brasil-como-na-india.shtml>. Taxa por 100 mil mulheres, ajustada pela idade com correção para países em desenvolvimento, levando em conta o IDH (Índice de Desenvolvimento Humano).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) e International Agency for Research on Cancer (IARC), este câncer é o quarto tipo mais incidente na população feminina brasileira (IARC, 2013; INCA, 2013). Estima-se para o ano de 2014 mais de 15 mil novos casos e o último índice de mortalidade notificado na população, foi no período de 2011 com 5.160 casos, sendo os estados do Amazonas, Maranhão e Acre com as maiores taxas de mortalidade no Brasil (figura 8) (INCA, 2013).

FIGURA 8. Diferenças regionais da mortalidade por câncer do colo do útero no Brasil em 2011.



Adaptado de INCA, GLOBOCAN (2012), IARC/OMS e <http://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/2014/01/1393209-cancer-do-colo-do-utero-mata-no-norte-do-brasil-como-na-india.shtml>. Taxas por 100 mil mulheres, ajustada para comparações internacionais.

Considerando as regiões brasileiras, as incidências de novos casos para 2014 (tabela 1) apontam que a região Norte ocupará a primeira posição seguidos pelas regiões Centro-Oeste e Nordeste que ocuparão a segunda posição. O Sudeste ocupará a quarta posição e em quinto lugar a região Sul (INCA, 2013).

TABELA 1. Taxas de incidência estimados por região para 2014.

	Norte	Centro- Oeste	Nordeste	Sudeste	Sul
Incidência	23,53*	22,19*	18,79*	10,15*	15,87*

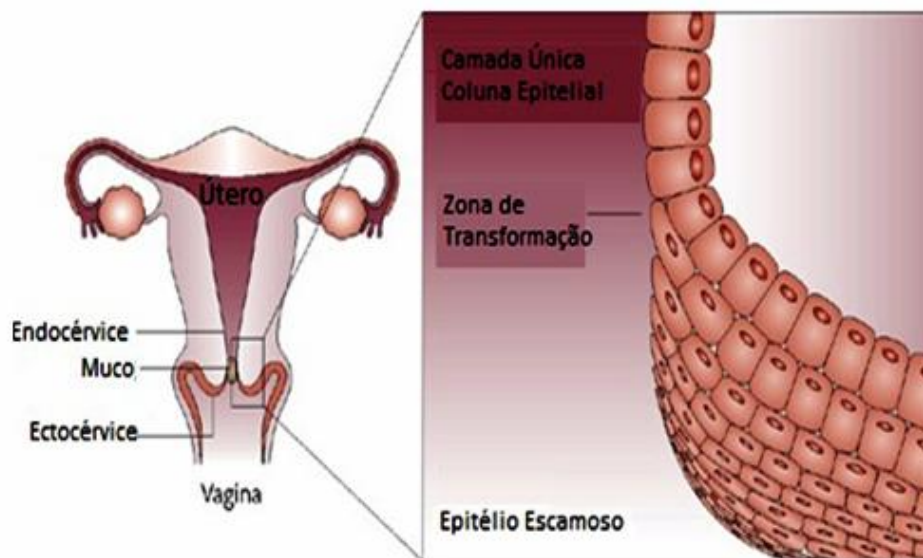
Adaptado de <http://www.inca.gov.br/estimativa>. INCA (2013). * por 100 mil habitantes.

1.2.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS

O útero é um órgão do aparelho reprodutor feminino que está situado no abdômen inferior por trás da bexiga e na frente do reto, sendo dividido em corpo e colo. O colo ou cérvix corresponde à porção caudal do órgão continuado pelo corpo uterino na sua parte superior, sendo o ponto de junção entre essas duas estruturas chamado de istmo. A vagina se dispõe em volta do colo permitindo separar-lhe uma porção supra vaginal e outra vaginal (MONTENEGRO & FILHO, 2011).

O colo uterino apresenta uma parte interna chamada de canal cervical ou de endocérvice que possui umas porções revestidas por uma camada única de células cilíndricas produtoras de muco (epitélio colunar simples). A parte externa que mantém contato com a vagina é chamada de ectocérvice e é revestida por um tecido de várias camadas de células planas (epitélio escamoso e estratificado). Entre esses dois epitélios encontra-se a junção escamocolunar (JEC), uma linha que pode estar tanto na ectocérvice como na endocérvice (figura 9), dependendo da situação hormonal da mulher (BRASIL, 2002, 2010; RAMA et al., 2008).

FIGURA 9. Anatomia do útero.

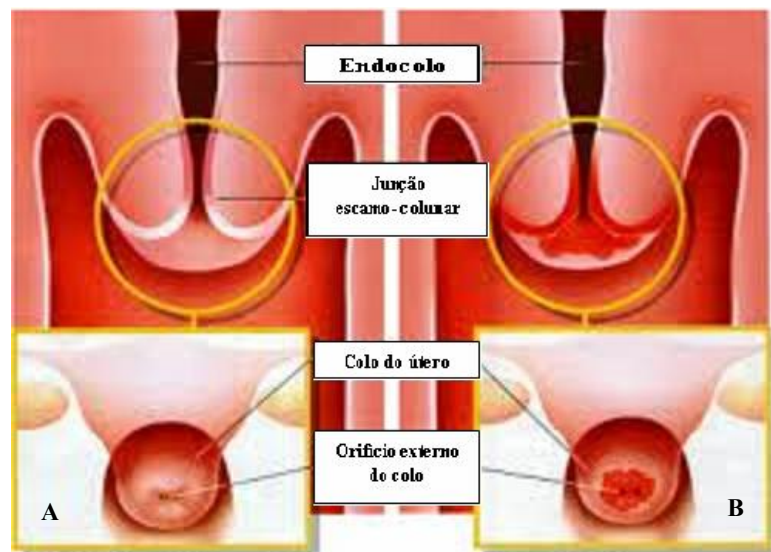


Adaptado de Hladik e Mcelrath (2008).

Nas mulheres, a acidificação do pH vaginal durante a adolescência, induz à substituição de uma parte do epitélio endocervical exposto por uma ectopia por um epitélio escamoso metaplásico. Este novo epitélio fica entre os epitélios originais e é conhecido como terceira mucosa ou zona de transformação (ZT). É nesta zona onde se localizam mais de 90% dos cânceres do colo uterino (figura 9 e 10) (HERFS et al, 2012). Além da ZT, células cilíndricas ou de reserva, também têm sido propostos como alvos de infecção (MARTENS et al., 2009).

Uma das funções do colo uterino é proteger a cavidade pélvica de quaisquer patógenos, através da secreção do muco e produção de anticorpos impedindo a disseminação desses microrganismos nesta região. No entanto, a ovulação que é acompanhada por hidratação e alcalinização do muco, diminui possivelmente a sua função de barreira protetora (BRASIL, 2002, 2010; RAMA et al., 2008).

FIGURA 10. Imagem do colo do útero saudável (A) e com lesão (B).



Adaptado: <http://povoadoriachosaudedafamilia.blogspot.com.br>

Nas últimas décadas, a relação entre a infecção pelo HPV e neoplasia gerou novos paradigmas de prevenção do câncer do colo uterino. A infecção do colo uterino pelo HPV é inicialmente um quadro assintomático, sendo necessário exames ginecológicos para identificação clínica. Convencionalmente, a citologia é o procedimento inicial de escolha, podendo ser agregado a um procedimento de

diagnóstico como a colposcopia, que é importante para a visualização do colo uterino, seguidos da retirada de um fragmento, quando necessário, para a análise histopatológico de confirmação (HERFS & CRUM, 2013).

A fim de estabelecer um padrão nas terminologias para diagnósticos, foi criado o Sistema Bethesda, durante uma reunião de especialistas realizada na cidade de mesmo nome em Maryland, EUA, no ano de 1988. Nessa reunião foram padronizadas as normas de classificação citológica, com o intuito de reduzir diagnósticos confusos entre alterações celulares benignas e as alterações atípicas, antes propostas por Papanicolaou, Reagan e Richart, conforme a Tabela 2 (VEIGA et al., 2006).

TABELA 2. Classificação das lesões pré-cancerosas do colo uterino.

PAPANICOLAOU (1943)	REAGAN (1953)	RICHART (1967)	BETHESDA (1988 /2001)
Classe I			
Classe II			
	HPV	HPV	HPV
	A	NIC I	LSIL (Baixo Grau)
	Displasia Leve		
Classe III (Suspeito)	B	NIC II	
	Displasia Moderada		
	C		
	Displasia Severa		HSIL (Alto Grau)
Classe IV	Carcinoma “in situ”	NIC III	
Classe V	Carcinoma invasivo	Carcinoma invasivo	Carcinoma invasivo

Adaptado de Araújo (2010) ; Saslow et al. (2012).

O Sistema Bethesda criou os termos citológicos de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (low grade intraepithelial lesion – LSIL) compreendendo as alterações sugestivas de infecção pelo HPV e neoplasias intraepiteliais de grau I (NIC I), de lesão intraepitelial escamosa de alto grau (high-grade intraepithelial lesion – HSIL), que englobam as expressões citológicas de NIC II e III, e as atípicas em células escamosas de significado indeterminado (atypical squamous cells of undetermined significance - ASC-US), que é definida pela presença de achados citológicos insuficientes para o diagnóstico de lesão intraepitelial (VEIGA et al., 2006; RUSSOMANO et al., 2008).

Em 2001, o Sistema Bethesda foi revisado e as alterações, anteriormente classificadas como ASC-US, foram subdivididas em células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) e células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau (ASC-H, sendo o H do inglês HSIL) (figura 11). Essa nova classificação se deve a uma tentativa de identificar melhor as alterações que podem representar as lesões precursoras do câncer de colo do útero (VEIGA et al., 2006; RUSSOMANO et al., 2008). Apesar de todas essas alterações, atualmente se usa três parâmetros para confirmar o diagnóstico, como o tipo de HPV cancerígeno, a expressão de p16^{INK4} e o grau histológico (WRIGHT et al., 2007; DE SANJOSE et al., 2010; GALGANO et al., 2010; SCHIFFMAN et al., 2011; FREITAS et al., 2013).

1.2.3. ETIOLOGIA

Já é bem estabelecido que a infecção por HPVs contribui para o desenvolvimento de câncer de colo uterino. No entanto, não é o único fator responsável pelo surgimento da doença. Diversos autores descrevem que os fatores imunológicos, tabagismo, etilismo, múltiplos parceiros, associações com outras DST's, como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e fatores genéticos favorecem significativamente para o desenvolvimento dessa neoplasia (PAPWORTH et al., 2001; PINTO et al., 2002; SHIBOSKI et al., 2005; RAMA et al., 2008; ANJOS et al., 2010; SASLOW et al., 2012).

A predisposição genética e as alterações nos genes de reparo no DNA podem estar associadas no desenvolvimento do câncer. Os genes envolvidos no reparo desempenham um papel crítico na primeira linha de defesa contra qualquer dano que o DNA venha a sofrer por fatores exógenos e endógenos (KARAHALIL et al. 2012). Os fatores exógenos ocorrem quando o DNA é exposto a uma ou mais variedades de agentes químicos como a radio e quimioterapia ou físicos como o calor e radiação. Os endógenos, que também interferem na integridade do genoma, provocam erros aleatórios de replicação genética ou nas atividades metabólicas normais das células, expondo o DNA a mutações, a instabilidade genômica e celular (KARAHALIL et al., 2002; FENTON & LONGO, 2005; FELLER et al., 2010).

1.3. GENES DE REPARO NO DNA

A integridade do genoma é mantida principalmente pelo monitoramento do DNA através das ações de enzimas de reparo e dos checkpoint do ciclo celular. Contudo, o mau funcionamento de um deles pode gerar instabilidade genômica contribuindo para o processo de carcinogênese (HALLIWELL et al., 1990; KANG et al., 2007; KARAHALIL et al., 2012).

O reparo no DNA é realizado por várias vias de reparo existentes, tais como o reparo por excisão de bases (BER – “Base excision repair”), por excisão de nucleotídeos (NER – “nucleotide excision repair”), por bases mal pareadas, por recombinação homóloga e por recombinação não-homóloga. Dessas, o BER constitui um mecanismo de proteção importante por reconhecer lesões específicas utilizando um sistema enzimático simples para a retirada da base lesada (FRIEDBERG et al., 1995; LU et al., 2001). Dentre as enzimas que fazem parte da via de reparo BER, destacam-se a Endonuclease apurínica/apirimidínica 1 (APE-1) e Poli (ADP-Ribose) Polimerase-1 (PARP-1).

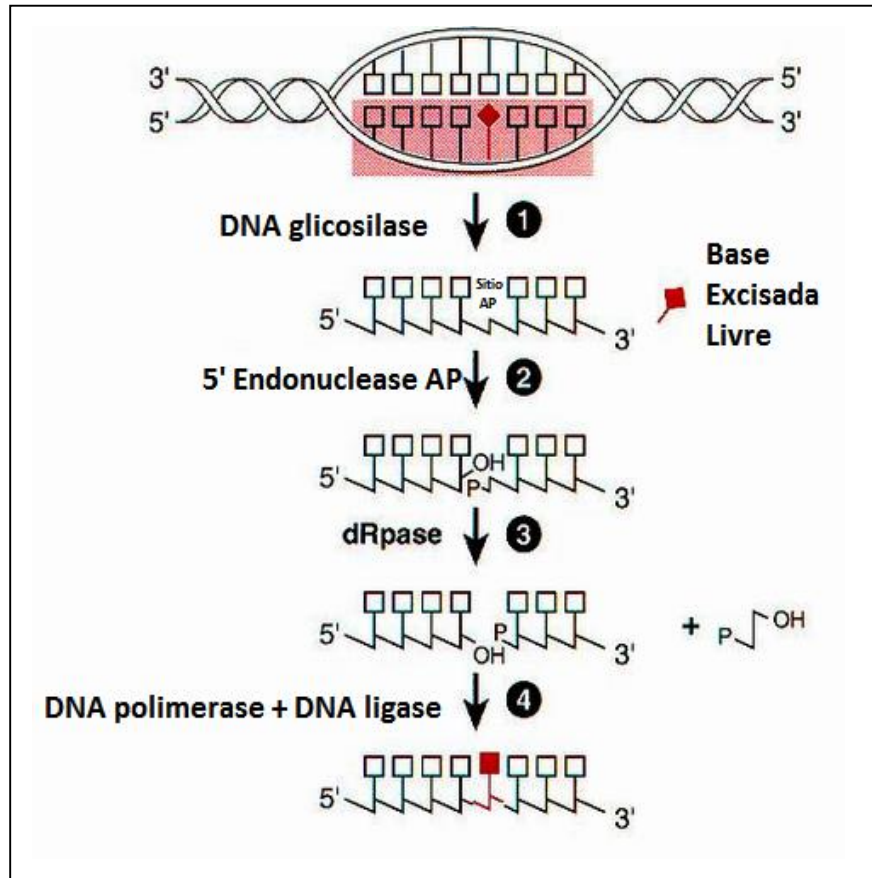
- ***Endonuclease apurínica/apirimidínica 1 (APE-1)***

APE-1 é a principal endonuclease apurínica/apirimidínica humana com atividade para processar sítios apurínico (AP). Essa enzima é conhecida também por APE, APEX, APX, HAP1 e REF1 (LO et al., 2009). O gene que codifica esta endonuclease se localiza no cromossomo 14q11.2-q12, apresenta um tamanho de 2.636pb, composto por 5 éxons e 4 íntrons. Codifica uma proteína de 35.555Da composta por 318aa (UCSC-Genome Bioinformatics; Genecards V3). Trata-se de uma proteína multifuncional que desempenha papel essencial na manutenção da integridade genômica e na regulação da expressão gênica (FRITZ GERHARD, 2000).

O reparo do DNA inicia com a atividade da DNA glicosilases que reconhece a base danificada clivando a ligação N-glicosídica da base resultando um sítio AP. Após esse reconhecimento, a endonuclease apurínica/apirimidínica (APE) é acionada servindo como um substrato para a enzima seguinte na via, promovendo uma excisão na fita do DNA na porção 5' do açúcar gerando uma lacuna de um nucleotídeo. O defeito resultante é reparado subsequentemente pela DNA polimerase β e as pontes fosfodiéster

pela DNA ligase III conforme apresentado na figura 12 (FRITZ GERHARD, 2000; LU et al., 2001; DING et al., 2004; AL-SAFI et al., 2012).

FIGURA 11. Esquema representativo da APE-1 no reparo no DNA.



Adaptado de <http://cmgm.stanford.edu/biochem/biochem201/Slides/DNA%20Repair%20-%20Doug/Base%20Excision%20Repair.JPG>. 1. Reconhecimento da base lesada. 2. Atuação da APE-1 no reparo. 3. A DNA desoxirribo-fosfodiesterase (dRpase) retira os resíduos 5'-fosfato-desoxirribose gerados. 4. DNA polimerase + DNA ligase completa a lacuna e repara a ligação da ponte de fosfodiéster, finalizando o reparo.

Os sítios AP são particularmente comuns, ocorrendo em condições fisiológicas normais da célula, no entanto estima-se que a frequência desses danos sejam de 10^4 lesões/célula/dia em humanos. Assim, essas lesões necessitam de um reparo contínuo (LU et al., 2001; KAUPPINEM, 2007).

APE-1 além de agir como um fator regulador negativo do seu próprio gene, participa da regulação redox de vários fatores de transcrição como ativador de proteínas (AP)-1, Fos, Jun, Fator Nuclear (NF)-kB, Myb, p53, entre outros (IZUMI et al., 1996; FRITZ, 2000; DING et al., 2004).

Durante o reparo, APE-1 interage com outras enzimas, como a DNA polimerase β , DNA ligase I, DNA ligase III, OGG1, XRCC1 e com a Poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) (LU et al., 2001; KARAHALIL et al. 2012).

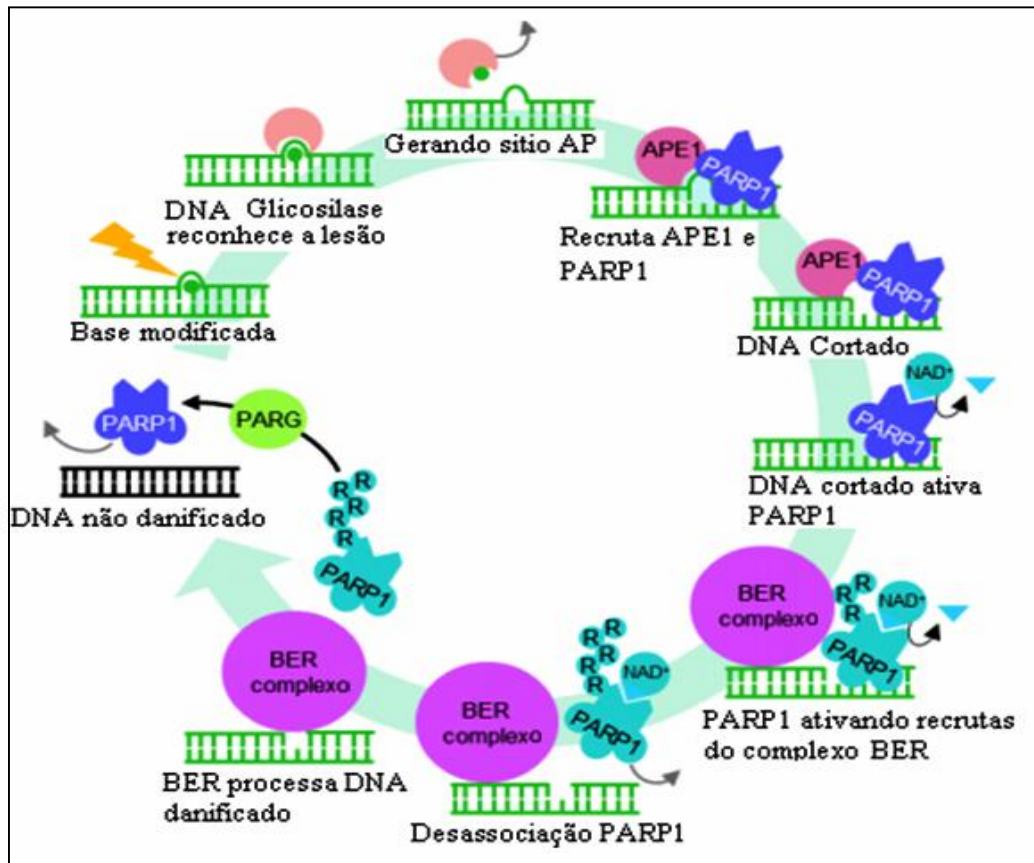
- ***Poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1)***

A enzima PARP-1, também identificada como PARP, PPOL, ADPRT, DPRT1 ou pADPRT-1. Encontra-se no cromossomo 1q41-q42 e apresenta um tamanho de 47.409pb composto por 23 éxons. Codifica uma proteína de 113.084Da, sendo composta por 1014aa (UCSC-Genome Bioinformatics; Genecards V3). As PARPs possuem uma família de 17 enzimas (HOTTIGER et al., 2010; BENEKE SASCHA, 2012).

Trata-se de uma proteína altamente conservada, abundante e bastante expressa na via de reparo BER. Está envolvida na modificação e remodelação da cromatina, no metabolismo do DNA e na expressão de genes (HASSA et al., 2005; SCHREIBER et al., 2006; BERTRAM & HASS, 2008), sendo composta por três domínios: o primeiro domínio é a região de ligação ao DNA, que possui a capacidade de quebrar a cadeia do DNA, o segundo domínio é uma região central de auto modificação rica em ácido glutâmico e o terceiro domínio é de ligação da NAD^+ com todas as atividades catalíticas da enzima (D'AMOURS et al., 1999; PERALTA-LEAL et al., 2009; BAI & CANTÓ, 2012).

PARP-1 é ativada por quebras (simples ou duplas) na fita de DNA (figura 13). Na função normal, OGG-1 (8-oxoguanina DNA glicosilase 1) gera sítios AP pela remoção do 8-oxoG e através de um mecanismo que não é completamente compreendido, recruta PARP-1 que possui a função de catalizar poli-ADP-ribosilação de proteínas, como histonas, cuja ribosilação confere uma carga negativa a essas proteínas, fazendo com que elas se repelem do DNA, gerando um relaxamento da cromatina local, permitindo que o material genético fique mais acessível à ação de enzimas de reparo (MABLEY et al., 2004; KAUPPINEN, 2007; MANGERICH & BURKLE, 2012).

FIGURA 12. Esquema representativo do papel da PARP1 no reparo por excisão de base (BER).



Adaptado de Ko & Ren (2012). PARP-1 também pode reparar o dano na fita simples no DNA através do recrutamento de complexos da BER.

Uma vez ativada por danos no DNA, PARP-1 atua em diversas funções celulares, como na síntese e transferência de polímeros de ADP-ribose para proteínas alvo, na remodelação da cromatina, na transcrição e replicação, no metabolismo de RNA, na inflamação, no controle do ciclo celular, na morte celular e na regulação do reparo no DNA, mantendo assim a integridade genômica. (GONZALES-REY et al., 2007; MANGERICH & BURKLE, 2012).

1.4. POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM GENES DE REPARO E SUA RELAÇÃO COM O CÂNCER DE COLO UTERINO

Os genes polimórficos apresentam variações alélicas com frequência superior a 1% na população. Estimativas apontam que cerca de 90% das variações de sequências em seres humanos são causadas por polimorfismos de substituição da base nitrogenada de um único nucleotídeo (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs) (GUIMARÃES & COSTA, 2002; HUNT et al., 2009). Os SNPs podem ser encontrados em regiões dos éxons, íntrons e sequências regulatórias do genoma. Quando ocorrem em regiões gênicas codificantes (éxons), os SNPs podem ser sinônimos (não causam a mudança de um aminoácido) ou não-sinônimos (quando um aminoácido é alterado) (HUNT et al., 2009).

Os polimorfismos em genes de reparo, tem sido descritos por pesquisadores como um dos fatores para a instabilidade genômica no DNA. Portanto, alterações em genes que possuem capacidade de reparar o DNA, contribuem para a desregulação do ciclo celular aumentando consequentemente o potencial carcinogênico da célula (FENTON & LONGO, 2005; FELLER et al., 2010). Atualmente a detecção dos polimorfismos tem sido utilizados como marcador de diagnóstico ou prognóstico para algumas doenças.

Assim, um total de 54 polimorfismos tem sido relatado no gene de *APE-1* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?geneId=328), dentre eles o mais estudado em vários cânceres como pulmão, próstata, coloretal, cabeça e pescoço (HU et al., 2013) é o polimorfismo Asp148Glu (rs1130409), resultado de uma transversoão do T para G no nucleotídeo de posição 2197 no códon 148 do éxon 5, devido a substituição do ácido Aspártico pelo ácido Glutâmico (HADI et al., 2000; LI et al., 2006). Foi mostrado que indivíduos portadores do alelo 148Glu apresentam uma maior sensibilidade à radiação ionizante do que os portadores do alelo 148Asn (HU et al., 2001; LI et al., 2006). Além disso, estudos funcionais do polimorfismo de APE1 (Asp148Glu) tem mostrado que a variante de Glu pode alterar a endonuclease e atividade de ligação ao DNA, reduzindo a capacidade de se comunicar com outras proteínas da via BER (HADI et al., 2000). No entanto, estudo tem demonstrados resultados diferentes a respeito deste polimorfismo devido a existência de fatores que podem influenciar no risco, tais como associação com outros polimorfismo em genes de reparo, além da etnia, do tabagismo e do álcool (MANDAL et al., 2012).

Outro polimorfismo estudado é o Val762Ala (rs1136410), dentre os 202 descrito no gene de *PARP-1* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=142). Este polimorfismo se deve a uma transição do T para C no nucleotídeo 40676 no códon 762 do éxon 17, promovendo a substituição do aminoácido Valina por Alanina no domínio catalítico. Esta mudança foi comprovada para reduzir drasticamente a atividade enzimática (LI et al., 2006; WANG et al., 2007). Estudos em câncer de colo uterino tem associado aos portadores do genótipo CC, um risco para o desenvolvimento deste câncer, enquanto que pacientes com neoplasia intraepitelial cervical (NIC) não fazem parte do grupo de risco. A presença do alelo C confere uma redução da atividade enzimática da PARP-1 (YE et al., 2012).

Tendo em vista que um dos mecanismos para o desenvolvimento do câncer de colo uterino são as lesões cervicais, se faz necessário investigar nas portadoras de lesão cervical e conforme o grau da lesão, os polimorfismos em enzimas que atuam no sistema de reparo da célula do hospedeiro, a fim de contribuir e definir um perfil genético identificando os grupos de risco para o desenvolvimento e progressão da doença.

1.5. PERGUNTA DE PARTIDA

- Os Polimorfismos nos genes de reparo *APE-1* Asp148Glu (T2197G) e *PARP-1* Val762Ala (T40676C) quando associado aos fatores sócio-epidemiológicos podem favorecer o desenvolvimento de NIC de maior gravidade?

1.6. HIPÓTESE DE TRABALHO

- Polimorfismos de enzimas reparo associados a fatores sócio-epidemiológicos contribuem para o desenvolvimento de NIC de maior gravidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Verificar a associação dos polimorfismos nos genes de reparo *APE-1* Asp148Glu (T2197G) e *PARP-1* Val762Ala (T40676C) com o desenvolvimento de NIC de diferentes gravidades.

2.2. Objetivo Específico

- Descrever os aspectos sócio-epidemiológicos das pacientes com lesões cervicais atendidas na Maternidade Escola Assis Chateaubriand-MEAC;
- Verificar as frequências genótípicas dos polimorfismos nos genes de *APE-1* Asp148Glu (T2197G) e *PARP-1* Val762Ala (T40676C) das pacientes atendidas na Maternidade Escola Assis Chateaubriand-MEAC ;
- Estimar o risco para o desenvolvimento da lesão cervical de diferentes gravidades considerando os polimorfismos nos genes de reparo *APE-1* Asp148Glu (T2197G) e *PARP-1* Val762Ala (T40676C);
- Verificar se o consumo de álcool, fumo, início de vida sexual precoce e o número de parceiros sexuais são fatores modificadores do risco quando considerando os polimorfismos nos genes de reparo *APE-1* Asp148Glu (T2197G) e *PARP-1* Val762Ala (T40676C).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAN, C.Y.; MENESES, P.I. Usage of heparan sulfate, integrins, and FAK in HPV16 infection. **Virology** 403, 1–16. 2010.

ABU, J.; BATUWANGALA, M.; HERBERT, K.; SYMONDS, P. Retinoic acid and retinoid receptors: potential chemopreventive and therapeutic role in cervical cancer. **The Lancet Oncology**. v6. pg712-720. Sept. 2005.

ALMEIDA, J.D.; ORIEL, J.D.; STANNARD, L.M. Characterization of the virus found in human genital warts. **Microbios.**, v. 3, p. 225-32, 1969.

AL-SAFI, R.I.; ODDE, S.; SHABAİK, Y.; NEAMATI, N. Small-Molecule Inhibitors of APE1 DNA Repair Function : An Overview, 14–35. 2012.

ANJOS, S.J.S.B; VASCONCELOS, C.T.M.; FRANCO, E.S.; ALMEIDA, P.C.; PINHEIRO, A.K.B. Fatores de risco para câncer de colo do útero segundo resultados de IVA, citologia e cervicografia. **Rev Esc Enferm**. 44 (4): 912-20. 2010.

ARAÚJO, S.R. Citologia Cérvico-vaginal. 1ª. Edição. **Freegraft**. Curitiba.119-139. 2010.

BAI, P.; CANTÓ, C. The role of PARP-1 and PARP-2 enzymes in metabolic regulation and disease. **Cell metabolism**, 16(3), 290–5. doi:10.1016/j.cmet.2012.06.016. 2012.

BENEKE SASCHA. Regulation of chromatin structure by poly(ADP-ribosyl)ation. **Frontiers in Genetics**. DOI:10.3389/fgene.2012.00169. 2012.

BERNARD, HANS-ULRICH. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **J Clin Virol**. 2S:S1–S6. 2005.

BERNARD, H.U.; BURK, R.D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K.; HAUSEN, H.; DE VILLIERS, E.M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, 401(1):70–9. 2010.

BERTRAM, C.; HASS, R. Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. **J. Biol. Chem**. 389: 211-220. 2008.

BRAGAGNOLO, A.L.; ELI, D.; HAAS, P. Papiloma Vírus Humano (HPV). **RBAC**, vol. 42 (2): 91-96, 2010.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Diretrizes Nacionais para a Atenção Integral à Saúde de Adolescentes e Jovens na Promoção, Proteção e Recuperação da Saúde. Brasília-DF.1ª edição. In:http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_atencao_saude_adolescentes_jovens_promocao_saude.pdf. 2010. Acesso: 20 de Out. 2013.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância (Conprev). Falando sobre

câncer do colo do útero. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde /INCA, 2002. Acesso: 20 de Out. 2013.

BRINGHENTI, M.E.Z.; DOZZA T.G.; DOZZA T.G.; MARTINS, T.R.; BAZZO M.L. Prevenção do Câncer Cervical: associação da Citologia oncótica a novas técnicas de Biologia Molecular na detecção do Papiloma vírus humano (HPV). **DST - J bras Doenças Sex Transm.** 22(3): 135-140. 2010.

BURK, R.D.; CHEN, Z.; DOORSLAER, K.V. Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. **Public Health Genomics**, v. 12, p. 281–290, 2009.

BUCK, C.B.; DAY, P.M.; TRUS, B.L. The papillomavirus major capsid protein L1. **Virology**, 445(1-2), 169–74. doi:10.1016/j.virol.2013.05.038. 2013.

CAMARA, G.N.N.; CRUZ, M.R.; VERAS, V.S.; MARTINS, C.R.F. Os papilomavírus humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. **Universitas Ciências da Saúde** - vol.01 n.01 - pp. 149-158. 2008.

CASTRO, T.P.P.G.; BUSSOLOTI FILHO, I. Prevalência do papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral e na orofaringe. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 72, n.2, p. 272-82, 2006.

CHOW, L.T.; BROKER, T.R.; STEINBERG, B.M. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. **APMIS**, v. 118, p. 422–449, 2010.

CIUFFO, GIUSEPPE. Innesto positive confiltrato di verruca volgare. **Giornale Ital. Mal. Ven. Pelle** 48: 12–17. 1907.

DAY, P.M.; GAMBHIRA, R.; RODEN, R.B.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Mechanisms of human papillomavirus type 16 neutralization by I2 cross-neutralizing and I1 type-specific antibodies. **J. Virol.** 82, 4638–4646. 2008.

D'AMOURS, D.; DESNOYERS, S.; D'SILVA, I.; POIRIER, G.G. Poly(ADP-ribose)ation reactions in the regulation of nuclear functions. **Biochem. J.** 342 (part.2):249-268. 1999.

DE SANJOSE, S.; QUINT, W.G.; ALEMANY, L.; GERAETS, D.T.; KLAUSTERMEIER, J.E.; LLOVERAS, B.; TOUS, S.; FELIX, A.; BRAVO, L.E.; SHIN, H.R.; VALLEJOS, C.S.; DE RUIZ, P.A.; LIMA, M.A.; GUIMERA, N.; CLAVERO, O.; ALEJO, M.; LLOMBART-BOSCH, A.; CHENG-YANG, C.; TATTI, S.A.; KASAMATSU, E.; ILJAZOVIC, E.; ODIDA, M.; PRADO, R.; SEUD, M.; GRCE, M.; USUBUTUN, A.; JAIN, A.; SUAREZ, G.A.; et al. Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: A retrospective cross-sectional worldwide study. **Lancet Oncol.** 11:1048–1056. 2010.

DE VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T.R.; BERNAD, H.U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17– 27, 2004.

DING, S.; O'HARA, A.M.; DENNING, T.L.; DIRDEN-KRAMER, B.; MIFFLIN, R.C.; REYES, V.E.; RYAN, K.A.; ELLIOTT, S.N.; IZUMI, T.; BOLDOGH, I.; MITRA, S.; ERNST, P.B.; CROWE, S.E. Helicobacter pylori and H2O2 Increase AP Endonuclease-1/Redox Factor-1 in Human Gastric Epithelial Cells. **Gastroenterology**. 127: 845-858. 2004.

DOORBAR, JOHN. The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol** ;32(Suppl):7-15. 2005.

DOORBAR, JOHN. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**. v 110, 525-541. 2006.

DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO, I.G.; STOLER, M.; BROKER, T.R.; STANLEY, M.A. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, 30 Suppl 5, F55-70. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.083. 2012.

FELLER, L.; WOOD, N.H.; KHAMMISSA, R.A.G.; LEMMER, J. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-ASSOCIATED ORAL AND OROPHARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA. Part 1: Human papillomavirus-mediated carcinogenesis. **Head & Face Medicine**. 6:14. 2010.

FENTON, R.G.; LONGO, D.L. Cancer cell biology and angiogenesis. In *Harrisons principles of internal medicine 16th edition*. Edited by: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Lango DL, Jameson JL. New York: **Graw-Hill**: 453-464. 2005.

FERRARO, C.T.L.; CANEDO, N.H.S.; PAULA DE OLIVEIRA, S.; CARVALHO, M.G.C. C.; DIAS, E.P. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. **J Bra Patol Med Lab**, Rio de Janeiro, v.47,n.4, p.451-459, agosto, 2011.

FLORES, E.R.; ALLEN-HOFFMANN, B.L.; LEE, D.; LAMBERT, P.F. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the reproductive stage of the viral cycle. **J. Virol**. 15: 6622-31, 2000.

FREITAS, A.C.; COIMBRA, E.C.; LEITÃO, M.D.C.G. Molecular targets of HEPV oncoproteins: Potential biomarkers for cervical carcinogenesis. **Biochimica et biophysica acta**. doi:10.1016/j.bbcan.2013.12.004. 2013.

FREITAS, A.C.; GURGEL, A.P.A.D.; CHAGAS, B.S.; COIMBRA, E.C.; DO AMARAL, C. M. M. Susceptibility to cervical cancer: an overview. **Gynecologic oncology**, 126(2), 304-11. doi:10.1016/j.ygyno.2012.03.047. 2012.

FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W. DNA repair and mutagenesis. **ASM Press**. Washington, D.C. 1995.

FRITZ GERHARD. Molecules in focus. Human APE/Ref-1 protein. **The international journal of biochemistry & cell biology**. 32: 925-929. 2000.

GALGANO, M.T.; CASTLE, P.E.; ATKINS, K.A.; BRIX, W.K.; NASSAU, S.R.; STOLER, M.H. Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. **Am J Surg Patho**. 134:1077-1087. 2010.

GARCÍA-TAMAYO, J.; MOLINA, J.; BLASCO-OLAETXEA, E. El virus del papiloma humano y el cáncer cervical. Una revisión de la historia actualizada sobre la investigación del cáncer del cuello uterino en Venezuela. **Invest Clin.**, v. 51, n. 2, p. 193-208, 2010.

GENECARDS V3 – **The Human Gene Compendium**. Disponível em: <http://www.genecards.org/> Acesso em: 21 de Out 2013.

GHITTONI, R.; ACCARDI, R.; HASAN, U.; GHEIT, T.; SYLLA, B.; TOMMASINO, M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human Papillomaviruses. **Virus Genes**, v. 40, p. 1-13, 2010.

GONZALES-REY, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, R.; OVALLE, F.; AGUILAR-QUESADA, R.; CONDE, C.; DELGADO, M.; OLIVER, F. J. Therapeutic effect of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 inhibitor on experimental arthritis by downregulating inflammation and Th1 response. **Plos one**. 10: 1-6. 2007.

GUIMARÃES, P.E.M.; COSTA, M.C.R. Sutis diferenças de um código. **Biociência e Desenvolvimento**, v. 26, p. 24-27, 2002.

HADI, M.Z.; COLEMAN, M.A.; FIDELIS, K.; MOHRENWEISER, H. W.; WILSON, D. M. Functional characterization of APE1 variants identified in the human population. **Nucl. Acids Res.** 3871-3879. 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.** 186: 1-85. 1990.

HASSA, P.O.; HAENNI, S.S.; BUERKI, C.; MEIER, N.I.; LANE, W.S.; OWEN, H.; GERSBACH, M.; IMHOF, R.; HOTTIGER, M.O. Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription. **J. Biol. Chem.** 280: 40450-40464. 2005.

HEBNER, C.M.; LAIMINS, L.A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev. Med. Virol.** v. 16, p. 83-97, 2006.

HERFS, M.; CRUM, C.P. Laboratory Management of Cervical Intraepithelial Neoplasia: Proposing a New Paradigm. **Adv Anat Pathol-** 20:86–94. 2013.

HERFS, M.; YAMAMOTO, Y.; LAURY, A.; WANG, X.; NUCCI, M.R.; MCLAUGHLIN-DRUBIN, M.E.; FELDMAN, S.; MCKEON, F.D.; XIAN, W.; CRUM, C.P.A. Discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 109(26), 10516–21. doi:10.1073/pnas.1202684109. 2012.

HLADIK, F.; MCELRATH, M.J. Setting the stage: host invasion by HIV. **Nature Reviews Immunology**. 8: 447-457. June- 2008.

HOTTIGER, M.O.; HASSA, P.O.; LUSCHER, B.; SCHULER, H.; KOCH-NOLTE, F. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. **Trends Biomchem. Sci.** 35: 208-219. 2010.

HOWLEY, P. M.; LOWY, D. R. Papillomaviruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; *et al.* **Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 3280p. 2001.

HU, D.; LIN, X.; ZHANG, H.; ZHENG, X.; NIU, W. APEX Nuclease (Multifunctional DNA Repair Enzyme) 1 Gene Asp148Glu Polymorphism and Cancer Risk: A MetaAnalysis Involving 58 Articles and 48903 Participants. **PLoS ONE** 8(12): e83527. doi:10.1371/journal.pone.0083527. 2013.

HU, J.J.; SMITH, T.R.; MILLER, M.S.; MOHRENWEISER, H.W.; GOLDEN, A.; CASE, L.D. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. **Carcinogenesis**. 22: 917-922. 2001.

HUANG, H.S.; LAMBERT, P.F. Use of an in vivo animal model for assessing the role of integrin alpha(6)beta(4) and syndecan-1 in early steps in papillomavirus infection. **Virology**. 433, 395–400. 2012.

HUNT, R.; SAUNA, Z.E.; AMBUDKAR, S.V.; GOTTESMAN, M.M.; KIMCHISARFATY, C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? **Methods Mol. Biol.** 578: 23-39. 2009.

HWANG, S.J.; SHROYER, K.R. Biomarkers of cervical dysplasia and carcinoma, **J. Oncol**, 1–9. 2012.

IARC - **International Agencyfor for Research on Cancer**. Citopatologia do colo uterino - atlas digital. In: <http://screening.iarc.fr/atlascyto.php?lang=4>. Acesso: 05 de Out. 2013.

INCA - **Instituto Nacional de Câncer**. Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero. Rio de Janeiro. 2011.
In:http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/Diretrizes_rastreamento_cancer_colo_uteropdf. Acesso: 15 de Out. 2013.

INCA- **Instituto Nacional de Câncer**. Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero Estimativa 2014 - Incidência de Câncer no Brasil. In: <http://www.inca.gov.br>. Acesso: 02 de Dez. 2013.

IZUMI, T.; HENNER, W.D.; MITRA, S. Negative regulation of the major human AP-endonuclease, a multifunctional protein, **Biochemistry**. 35: 14679-14683. 1996.

KANG, S.K.; LEE, K.K.; LEE, W.; SHIW, J.Y.; JI, S.I.; CHUNG, K.W. CHUNG, Y.K.; KIM, N.K Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 associated whit basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin in a Korean population. **Cancer Sci**. 98: 716-712. 2007.

KARAHALIL, B.; BOHR, V.A.; WILSON III, D.M. Impact of DNA polymorphisms in key DNA base excision repair proteins on cancer risk. **Humam and Experimental Toxicology**. 31(10) 981-1005. 2012.

KARAHALIL, B.; HOGUE, B.A.; de SOUZA-PINTO, N.C.; BOHR, V.V. Base excision repair capacity in mitochondria and nuclei: tissue-specific variations. **FASEB J.** 16:1895-1902. 2002.

KAUPPINEN, T.M. Multiple roles for poly (ADP-ribose)polymerase-1 in neurological disease. **Neurochemistry International.** 50: 954-958. 2007.

KIVI, N.; GRECO, D.; AUVINEN, P.; AUVINEN, E. Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. **Oncogene**, v. 27, p. 2532-2541, 2008.

KO, H.L.; REN, E.C. Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription. **Biomolecules.** 2, 524-548; 10.3390/biom2040524. 2012.

KOVANDA, A.; KOCJAN, B.T.; NIK, M.P.; POLJAK, M. Characterization of a Novel Cutaneous Human Papillomavirus Genotype HPV-125. **PLoS One.** v. 6. n.7. July 2011.

JOHNSON, K.M.; KINES, R.C.; ROBERTS, J.N.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T.; DAY, P.M. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. **J. Virol.** 83, 2067–2074. 2009.

LETO, M.G.P.; SANTOS JUNIOR, G.F.; PORRO, A.M.; TOMIMORI, J. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **An. Bras. Dermatol.** [online], vol.86, n.2, pp. 306-317, 2011.

LI, C.; LIU, Z.; WANG, L.; STROM, S.S.; LEE, J.E.; GERSHENWALD, J.E.; ROSS, M.I.; MANSFIELD, P.F.; CORMIER, J.N.; PRIETO, V.G.; DUVIC, M.; GRIMM, E.A.; WEI, Q. Genetic variants of the ADPRT, XRCC1 and APE1 genes and risk of cutaneous melanoma. **Carcinogenesis.** 27: 1894–1901. 2006.

LO, Y.L.; JOU, Y.S.; HSIAO, C.F.; CHANG, G.C.; TSAI, Y.; SU, W.C.; CHEN, K.Y.; CHEN, Y.M.; HUANG, M.S.; HU, C.Y.; CHEN, C.J.; HSIUNG, C.A. A polymorphism in the APE1 gene promoter is associated with lung cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkes Prev.** 18:223-229. 2009.

LU, A.; LI, X.; GU, Y.; WRIGHT, P.M.; CHANG, D. Repair of Oxidative DNA damage (Review). **Cell Biochem Biophys.** 35: 141-170. 2001.

MABLEY, J.G.; PACHER, P.; DEB, A.; WALLACE, R.; ELDER, R.H.; SZABO, C. Potential role for 8-oxoguanine DNA glycosylase in regulating inflammation. **The FASEB Journal.** 1-18. 2004.

MANDAL, R.K.; GANGWAR, R.; KAPOOR, R.; MITTAL, R.D. Polymorphisms in base-excision & nucleotide-excision repair genes & prostate cancer risk in north Indian population. **Indian J Med Res.** 135: pp 64-71. 2012.

MANGERICH, A.; BÜRKLE, A. Pleiotropic Cellular Functions of PARP1 in Longevity and Aging: Genome Maintenance Meets Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** DOI:10.1155/2012/321653. 19p. 2012.

MARTENS, J.E.; SMEDTS, F.M.; PLOEGER, D.; HELMERHORST, T.J.; RAMAEKERS, F.C.; ARENDS, J.W.; HOPMAN, A.H. Distribution pattern and marker profile show two subpopulations of reserve cells in the endocervical canal. **Int J Gynecol Pathol.** 28:381–388. 2009.

MCMURRAY, H.R.; NGUYEN, D.; WESTBROOK, T.F.; MCANCE, D.J. Biology of human papillomaviruses. **Journal of Experimental Pathology.** 82. 15-33. 2001.

MONTENEGRO, C.A.B.; FILHO, J.R. Bases morfológicas e funcionais do sistema genital. pg3-21. 12 ed. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, 2011.

NCBI- **National Center for Biotechnology Information.**

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?geneId=328

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=142. Acesso: 05 de Maio 2014.

NAKAGAWA, J.T.T.; SCHIRMER, J.; BARBIERI, M. Vírus HPV e câncer de colo de útero. **Rev. bras. enferm.** [online]. vol.63, n.2, pp. 307-311. ISSN 0034-7167. 2010.

PAPANICOLAOU, G.N.; TRAUT, H.F. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* Vol.42, N°2. 1941.

PAPWORTH, R.; SLEVIN, N.; ROBERTS, S.A.; SCOTT, D. Sensitivity to radiation-induced chromosome damage may be a marker of genetic predisposition in young head and neck cancer patients. **Br J Cancer** 84:776–782. 2001.

PERALTA-LEAL, A.; RODRÍGUEZ-VARGAS, J.M.; AGUILAR-QUESADA, R.; RODRÍGUEZ, M.I.; LINARES, J.L.; ALMODÓVAR, M.R.; OLIVER, F.J. PARP inhibitors: New partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. **Free Radical Biology & Medicine.** 47:13-26. 2009.

PIM, D.; BANKS, L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. **APMIS**, v. 118, p. 471-493, 2010.

PINTO, F.N.; PRUDENTE, F.V.B.; GONÇALVES, M.S.; SILVA, P.D.V.; GIGLIO, A.D. Mutaç o do gene p53 induzindo predisposi o heredit ria ao c ncer: relato de um caso da síndrome de Li-Fraumeni. **Rev. Med.** v. 81, n. 1/4, p. 42-6.2002.

RAMA, C.H.; ROTELI-MARTINS, C.M.; DERCHAIN, S.F.M.; LONGATTO-FILHO, A.; GONTIJO, R.C.; SARIAN, L.O.Z.; SYRJÄNEN, K.; ALDRIGHI, J. M. Prevalence of genital HPV infection among women screened for cervical c ncer. **Rev. Saúde Pública;** 42(1):123-30. 2008.

RAPAPORT, D. Biologia do HPV. In: ROSENBLATT, C.; WROCLAWSKI, E.R.; LUCON, A.M.; PEREYRA, E.A.G. HPV na Pr tica Clínica. São Paulo: **Atheneu.** p.7-23, 2005.

RICHARDS, R.M.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T.; DAY, P.M. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 103, 1522–1527. 2006.

RIGONI-STERM, D. Fatti statistici relative alle malattie cancerose che servirono de base alla poche cose dette dal dott. **Giornale Service Propr.Pathol.Terap.Ser.** 2: 507–517. 1842.

ROBERTS, S.; ASHMOLE, I.; GIBSON, L.J.; ROOKES S.M.; BARTON, G.J.; GALLIMORE, P.H. Mutational Analysis of Human Papillomavirus E4 Proteins: Identification of Structural Features Important in the Formation of Cytoplasmic E4/Cytokeratin Networks in Epithelial Cells. **Journal Of Virology**, Oct.,p.6432-6445 Vol.68, No.10. 1994.

RODEN, R.; WU, T.C. How will HPV vaccines affect cervical cancer? **Nature Reviews Cancer**. 6: 753-763. October 2006.

ROSA, M. I.; MEDEIROS, L.R.; ROSA, D.D.; BOZETI, M.C.; SILVA, F.R.; SILVA, F.R.; SILVA, B.R. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, n. 5, p. 953-964, 2009.

RUSSOMANO, F.; MONTEIRO, A.C.S.; MOUSINHO, R.O. O diagnóstico citológico de células escamosas atípicas - uma avaliação crítica das recomendações diagnósticas. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** vol.30 no.11 Rio de Janeiro Nov. 2008.

SAAVEDRA, K.; BREBI, P.; ROA, J.C. Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix, **Clinical Eepigenetics Journal**. 1–7. 2012.

SANTANA, E.A.; BISELLI, P.M.; BISELLI, J.M.; ALMEIDA, M.T.G.; BERTELLI, E.C.P. Câncer cervical: etiologia, diagnóstico e prevenção. **Arq Ciênc Saúde**. out/dez;15(4):199-204. 2008.

SASLOW, D.; SOLOMON, D.; LAWSON, H.W.; KILLACKEY, M.; KULASINGAM, S. L.; CAIN, J.; GARCIA, F.A.R.; MORIARTY, A.T.; WAXMAN, A.G.; WILBUR, D.C.; WENTZENSEN, N.; DOWNS JR, L.S.; SPITZER, M.; MOSCICKI, A.; FRANCO, E.L.; STOLER, M.H.; SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P.E.; MYERS, E.R. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. **Cancer J Clin**. 62:147-172. 2012.

SCHREIBER, V.; DANTZER, F.; AME, J.C.; DE MURCIA, G. Poly(ADP-ribose): Novel functions for an old molecule. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**. 7: 517–528. 2006.

SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N.; WACHOLDER, S.; KINNEY, W.; GAGE, J.C.; CASTLE, P.E. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. **J Natl Cancer Inst**.103:368–383. 2011.

SELINKA, H.C.; FLORIN, L.; PATEL, H.D.; FREITAG, K.; SCHMIDTKE, M.; MAKAROV, V.A.; SAPP, M. Inhibition of transfer to secondary receptors by heparan sulfatebinding drug or antibody induces noninfectious uptake of human papillomavirus. **J. Virol**. 81, 10970–10980. 2007.

SHIBOSKI, C.H.; SCHMIDT, B.L.; JORDAN, R.C. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the US population ages 20–44 years. **Cancer**. 103:1843–1849. 2005.

SICHERO, L.; SOBRINHO, J.S.; VILLA, L.L. Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants. **Virology**.v.432. p.127-132. 2012.

SILVA, A.M.T.C.; AMARAL, M.V.T.; CRUZ, A.D. HPV e Câncer: O papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. **Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**. Brasília. Ano 5. n.29. nov/dez, 2002.

SOUTO, R.; FALHARI, J.P.B.; DIVINO DA CRUZ, A. O papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Goiânia, 51(2), p.155-160, 2005.

STRAUSS, M.J.; SHAW, E.W.; BUNTING, H.; MELNICK, J.L. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 72, 46–50. 1949.

SYRJÄNEN, S.; SYRJÄNEN, K. The History of Papillomavirus Research. **Cent. Eur. J. Public Health**, v.16, p. 7-14, Suplemento. 2008.

UCSC – **Genome Bioinformatics**. Disponível em: <http://genome.cse.ucsc.edu/> Acesso: 20 de Out. 2013.

VEIGA, F.R.; RUSSOMANO, F.; CAMARGO, M.J.; MONTEIRO, A.C.S.; TRISTÃO, M.A. Prevalência das lesões intra-epiteliais de alto grau em pacientes com citologia com diagnóstico persistente de ASCUS. **Rev Bras Ginecol Obstet**. 28(2): 75-80. 2006.

VILLA, L.L. Human papillomavirus and cervical cancer. **Adv Cancer Res**. 71: 321-41, 1997.

WANG, X.G.; WANG, Z.Q.; TONG, W.M.; SHEN, Y. PARP1 Val762Ala polymorphism reduces enzymatic activity. **Biochem Biophys Res Commun**. 354:122 – 6. 2007.

WHO- **World Health Organization**. ICO Information Centre on Human Papilloma Virus (HPV) and Cervical Cancer. Human papillomavirus and related cancers in Brazil. In: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/> (Summary Report 2010) Acesso: 05 de Nov. 2013.

WOLF, M.; GARCEA, R.L.; GRIGORIEFF, N.; HARRISON, S.C. Subunit interactions in bovine papillomavirus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 2010.

WRIGHT, T.C.JR.; MASSAD, L.S.; DUNTON, C.J.; SPITZER, M.; WILKINSON, E.J.; SOLOMON, D. 2006 American Society for Colposcopy and Cervical Pathologysponsored Consensus Conference 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. **Am J Obstet Gynecol** 197:346–355. 2007.

YE, F.; CHENG, Q.; HU, Y.; ZHANG, JING.; CHEN, H. PARP-1 Val762Ala Polymorphism Is Associated with Risk of Cervical Carcinoma. **PLoS ONE**. 7(5): e37446. doi:10.1371/journal.pone.0037446. 2012.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. **Virology**, v. 384, p. 260-265, 2009.

ZUR HAUSEN, H.; MEINHOF, W.; SCHEIBER, W.; BORNKAMM, G.W. Attempts to detect virus specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. **Int. J. Cancer**, v. 13, n. 5, p. 650-6, 1974.

APÊNDICE I - ARTIGO

APE-1 (Asp148Glu) AND PARP-1 (Val762Ala) POLYMORPHISMS IN CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA PATIENTS: INFLUENCE OF RISK FACTORS

Tatiana Dantas Rodrigues ¹, Érika Hardy Lemos ², Gedeane Taveira ³, José Eleutério Júnior ⁴, João Paulo Pordeus Gomes ⁵, Silvia Helena Barem Rabenhorst ^{6*}

1,2,3,6, Molecular Genetics Laboratory, Department of Pathology and Forensic Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará.

4, Department of Medicine, of Maternity School Assis Chateaubriand (MEAC) Federal University of Ceará.

5, Logics and Artificial Intelligence Lab, Department of Computer Science, Federal University of Ceará.

* Corresponding author: Silvia Helena Barem Rabenhorst. Mailing address: Laboratório de Genética Molecular – LABGEM, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará - UFC, Coronel Nunes de Melo, 1315, Rodolfo Teófilo, Tefelone: 55(85) 33668639. Fortaleza, CE. CEP 60430-270, Brazil.

ABSTRACT

High-grade cervical intraepithelial neoplasia disease (CIN) is the pre-cursor neoplasia of cervical cancer which is the second most common cancer in women worldwide. Repair enzymes are important for genomic integrity, and polymorphism in genes of DNA base excision repair (BER) enzymes can be relevant to susceptibility to cervical lesions. Therefore, this study aimed to investigate the association of polymorphisms *APE-1* Asp148Glu (rs1130409 T>G) and *PARP-1* Val762Ala (rs1136410 T>C), with smoking, alcohol consumption, onset of sexual activity and number of sexual partners per year in cervical intraepithelial neoplasia disease. **Materials and Methods** - This case-control study included 203 women attended at the Cervical Pathology Service of the Maternity School Assis Chateaubriand. CIN was confirmed 75 cases and the remaining, 128 cases were considered the control group. The polymorphisms for the DNA repair genes *APE-1* T>G and *PARP-1* T>C were determined by PCR-RFLP. The data were analyzed by the program SPSS® 20 version and Data Mining Book 3.6.11 version. **Results** - The median ages of the patients included in the study was 24 years old. Among the CIN cases 66.7% were CIN I and 33.3% were CIN II/CIN III. Lower frequency of the *PARP-1* heterozygous genotype was statically associated with CIN I. Considering the risk factors, the *PARP-1* TC genotype conferred a decreased risk of CIN developing in women who drank alcohol ($p = 0.046$) and had one or no partner per year ($p = 0.000$). Comparison between the control group and CIN subtypes (CIN I and CIN II/III) showed that among patients with ≤ 1 sexual partner/year, CIN I patients had a statistically low frequency of the *PARP-1* TC genotype ($p = 0.010$). No association was found for *APE-1* T>G polymorphism. WEKA software was used to evaluate all potential variables demonstrating that patients age (cutoff 25 years old), followed by early onset of sexual activity (<18), were the variables with the greatest risk potential for the development of cervical lesion development. *PARP-1* polymorphic homozygote genotype (CC) was associated with CIN in patients who started early onset of sexual life, while *PARP-1* wild homozygous genotype (TT) was considered an important factor for the development of cervical lesion in patients who lacked fixed partners. **Conclusion** - These data suggest that the efficiency of the heterozygous genotype for DNA repair is dependent on risk exposure. Also confirm the literature that age and early onset of sexual activity (<18), are important risk factors for cervical lesion. This study contributes to our understanding of the association between *PARP-1* Val762Ala (T40676C) polymorphism and CIN and is the first to include the *APE-1* Asp148Glu (T2197G) polymorphism in such a CIN study.

Keywords: Cervical Cancer, APE-1 and PARP-1, Repair Enzymes

INTRODUCTION

Cervical cancer is the second most common cancer in women worldwide, with around 530.000 new cases annually¹. In Brazil, cervical cancer is the third most frequent cancer in the female population².

In cervical carcinogenesis, human papillomavirus (HPV) infection plays a central role and is a necessary condition in cervical cancer development³. High grade cervical intraepithelial neoplasia disease (CIN II/III) resulting from cellular transformation by high-risk HPV, are the precursor lesion of cervical cancer. HPV infection often occurs shortly after initiation of sexual activity and seems to increase in frequency over the years after the sexual debut, as well as with the number of the sexual partners⁴. Besides, it is estimated that the most sexually active persons will have HPV infection at least once in their lifetime⁴, with only a small fraction progressing to cervical cancer or its precursor lesion cervical intraepithelial neoplasia (CIN), suggesting that other genetic factors may be involved in these processes.

In cervical carcinogenesis, the loss of cell cycle control and DNA damage has been shown to be due to an inactivation of TP53 and RB proteins, though binding with HPV E6 and E7 oncoproteins^{5, 6, 7}. The presence of DNA damage, in turn, activates the DNA repair enzyme machinery. Five main DNA repair pathways play key roles in maintaining genome stability, including base excision repair (BER)^{8,9}.

Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE-1) is a multifunctional enzyme that plays a crucial role in the BER pathway by hydrolyzing the phosphodiester backbone immediately 5' to the abasic sites in DNA. APE1 can act as a 3'-phosphodiesterase, which is necessary to initiate repair of DNA single- or double-strand breaks. In addition, APE-1 plays a role in regulating the DNA binding capacity of several transcription factors and thus gene expression efficiency^{9,10}. The *APE-1* gene localizes on chromosome 14q112-12 and consists of four introns and five exons coding for a protein of 318 amino acids, whose expression is induced by oxidative stress^{11, 12, 13}.

Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1), the best characterized member of the PARP family, is another important BER enzyme for DNA repair and genome stability¹⁴. It is a DNA strand break-sensing protein, and its activation is one of the early responses to DNA damage. PARP-1 is multifunctional nuclear protein that works in transcriptional regulation and histone modification and is involved in differentiation and

cell survival and death, as well as being a master component of a number of transcription factors involved in tumor development and inflammation^{12, 15,16}.

Studies have reported that a single nucleotide polymorphism (SNP) in the *APE-1* gene, due to a variation of amino acid change aspartic acid to glutamic acid in exon 5 (Asp148Glu, T2197G) (rs1130409), is associated with hypersensitivity to ionizing radiation and cancer risk for ovarian, gastro-esophageal, pancreatobiliary and cervical cancer^{9, 17, 18}. Ethnicity and risk factors, such as smoking and alcohol consumption, can modify the risk in the same type of cancer (such as lung, prostate and colorectal cancer), where it is associated with the frequency of the G allele and the homozygous polymorphic genotype^{19, 20, 21}. On the other hand, in the *PARP-1* Val762Ala (T40676C) polymorphism (rs1136410), the substitution of valine to alanine confers a reduction in enzymatic activity of PARP-1 protein, where it is associated with increased risk of colorectal¹⁸, prostate²², breast²³ and cervical cancer²⁴.

There were only three studies addressing CIN lesions, cancer and the PARP-1 polymorphism Val762Ala (T40676C)^{24, 25, 26} and no study of cervical cancer including APE-1 Asp148Glu (T2197G), at the time of preparing this paper. Taking in account the importance of cancer prevention considering the genetic predisposition, it is important studies of risk associating polymorphisms in these lesions. Therefore, this study aimed to verify the importance of these polymorphisms in CIN of different grades.

MATERIALS AND METHODS

Patients

This was a case-control study that included 203 women attended at the Cervical Pathology Service of the Maternity School Assis Chateaubriand (MEAC) in Fortaleza, Ceará, Brazil, during 2010-2013. Excluded from this study were immunosuppressed patients and those treated for cervical disease ablation (cryotherapy or laser ablation). Patients with areas with suspicious lesions were biopsied for histopathologic diagnosis at the Pathology Laboratory of the Federal University of Ceará (UFC) as routine protocol. The criteria for histopathologic diagnosis of CIN were those established by WHO, where cases were classified as mild dysplasia (CIN I) or moderate and severe dysplasia (CIN II and CIN III) and CIN negative for other pathologies with no cervical neoplastic changes identified²⁷. Every patient answered a questionnaire regarding socio-

epidemiological and clinical data further clinical diseases information was obtained from hospital records.

The present study was submitted to the National Council on Ethics in Research - CONEP and approved by the Ethics Committee of the Maternity School Assis Chateaubriand (MEAC) on April 12, 2011, CEP/MEAC No 0035/11, Protocol 17/11.

DNA extraction

DNA was extracted from the peripheral blood samples using the salting-out method as described by Regitano (2001). DNA was quantified using a Thermo NanoDrop Na-1000 Spectrophotometer, and DNA quality was checked on a 1% agarose gel with ethidium bromide staining.

Polymorphism of the DNA repair genes APE-1 (T>G) and PARP-1 (A>G)

SNPs for DNA repair genes were determined by a PCR-RFLP (PCR followed by enzyme restriction) *APE-1* T>G and *PARP-1* T>C PCR products were generated in reaction mixtures of 20 μ L, containing 1X MasterMix (PROMEGA Madison, WI USA) 0.5 μ M each primer and 25 ng DNA template. The amplified fragments were visualized in 1% agarose gels containing ethidium bromide under UV light and were digested with appropriate restriction endonucleases. In all restriction was performed with a known polymorphic homozygous genotype as control. The primers, restriction enzymes and the fragment size are described in Table I. The fragments were resolved on 8% non-denaturing polyacrylamide electrophoretic gels and silver staining.

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using the EPINFO® 70 or SPSS® 20 version statistical software program (SPSS, Chicago, IL, USA) and Data Mining Book program 3.6.11 version with the method C4.5 of Weka The University of Waikato. Statistically significant differences were evaluated by the chi-square test (χ^2) and Fisher's exact test Correlations between risk factors and the polymorphisms studied were analyzed using Spearman's rank correlation coefficient. Haplotype analysis was done by the UNPHASED 3.17 program $p \leq 005$ was regarded as statistically significant.

Table I. Description of primers used for repair enzymes.

Genetic polymorphism	Primer sequence	Restriction temp. (°C)	Restriction enzyme	Fragments size	Author
<i>APE-1</i> (Asn148Glu)	F:5'CTGTTTCATTCTATAGGCTA3' R:5'AGGAACTTGCGAAAGGCTTC3'	37°C	<i>BfaI</i>	T 164 G 144 and 20	[40]
<i>PARP-1</i> (Val762Ala)	F:5'TTTGCTCCTCCAGGCCAACG3' R:5'ACATCGATGGGATCCTTGCTGC3'	60°C	<i>BstUI</i>	T 127 C 107 and 20	[41]

RESULTS

Characteristics of the study population

The median age of the patients included in this study was 24 years old (ranging from 14 to 50 years). The majority of the patients (201/203, 99%) provided their socio-epidemiological and clinical data, where 53.1% were single. Smoking was reported by only 9% of the patients and drinking of alcoholic beverages by 34%. Beginning of sexual life after 18 years old was reported by 35% (69/197) of the patients and 73.4% (141/192) of the patients had one partner during one year.

Among the 203 patients with suspected atypical changes, 51.2% (104/203) underwent cervical biopsy, of which 72.1% (75/104) had confirmed presence of CIN. The control group included the cervical biopsied CIN negative patients (29/104, 27.9%) and patients who had no biopsy indication (99/203, 48.8%). The histopathology characteristics of the biopsied CIN negative patients were presence of polyps, fibroids and cervicitis. The median ages of the patient groups were: CIN (+) 28 years old (14 to 50 years) and control group 22 years old (14 to 50).

Genotype and allele frequencies of APE-1 and PARP-1 SNPs and risk analysis according to cervical intraepithelial lesion grade (CIN I and CIN II/III)

Genotype distributions for both SNPs studied were in Hardy-Weinberg equilibrium for the patients CIN (+). For *PARP-1* T>C polymorphism, the control group

was not in Hardy-Weinberg equilibrium. No significant association was observed when all patients CIN (+) were compared with the control for both polymorphisms studied. However, when the CIN grades were considered (Table II), a significantly lower frequency of the heterozygous genotype of *PARP-1* (TC) was observed in CIN I patients. No association regarding the *APE-1* T>G genotypes was observed between the total of CIN (+) cases or grades and control. Furthermore, no significant association between the patient groups was found when the *PARP-1* T>C and *APE-1* T>G genotypes were combined. Considering the haplotype analyzes no significant statistics for genotype of genes *APE-1* and *PARP-1*.

Table II. Analysis of the genotype and allele frequencies of *APE-1* and *PARP-1* SNPs with CIN grades and control.

<i>APE-1</i> (T2197G)	Control	CIN I	<i>P</i>	OR (CI)	CIN II/III	<i>P</i>	OR (CI)
	N = 128 (%)	N = 50 (%)			N = 25 (%)		
TT	53 (41.4)	23 (46)		1 ^{ref}	13 (52)		1 ^{ref}
TG	61 (47.7)	21 (42)	0.514	0.793 (0.395 - 1.592)	10 (40)	0.379	0.668 (0.271 - 1.648)
GG	14 (10.9)	6 (12)	0.981	0.987 (0.337 - 2.891)	2 (8)	0.723	0.582 (0.117 - 2.887)
TT/TG	114 (89.1)	44 (88)	0.701	0.889 (0.487 - 1.621)	23 (92)	0.611	0.822 (0.386 - 1.748)
TG/GG	75 (58.6)	27 (54)	0.577	0.829 (0.429 - 1.601)	12 (48)	0.327	0.652 (0.276 - 1.541)
T	167 (65.2)	67 (67)		1 ^{ref}	36 (72)		1 ^{ref}
G	89 (34.8)	33 (33)	0.752	0.924 (0.566 - 1.508)	14 (28)	0.354	0.729 (0.373 - 1.424)
<i>PARP-1</i> (T40676 C)	Control	CIN I	<i>P</i>	OR (CI)	CIN II/III	<i>P</i>	OR (CI)
	N = 128 (%)	N = 50 (%)			N = 25 (%)		
TT	55 (43)	29 (58)		1 ^{ref}	13 (52)		1 ^{ref}
TC	70 (54.7)	18 (36)	0.038 *	0.487 (0.245 - 0.968)	12 (48)	0.463	0.725 (0.306 - 1.714)
CC	3 (2.3)	3 (6)	0.662	1.896 (0.359 - 9.997)	0 (0)	1	0.000 (Undefined)
TT/TC	123 (97.7)	47 (94)	0.260	0.724 (0.413 - 1.270)	25 (100)	0.689	0.859 (0.409 - 1.805)
TC/CC	73 (57)	21 (42)	0.071	0.545 (0.281 - 1.057)	12 (48)	0.405	0.695 (0.294 - 1.642)
T	180 (70.3)	76 (76)		1 ^{ref}	38 (76)		1 ^{ref}
C	76 (29.7)	24 (24)	0.283	0.747 (0.439 - 1.272)	12 (24)	0.416	0.747 (0.370 - 1.509)

N: Number of patients with CIN subtypes positive and control. OR (CI) corresponds to control vs CIN I and control vs CIN II/III. * Chi-squared test, OR: odds ratio, CI: confidence interval. $p \leq 0.05$.

Analysis of risk considering APE-1 and PARP-1 SNPs with alcohol consumption , smoking status and sexual life in patients CIN(+) and control

No significant association between *APE-1* genotypes and the above mentioned risk factors was found. However, for *PARP-1* T>C genotypes, the *PARP-1* TC genotype conferred a decreased risk for CIN developing among patients who had low exposure to risk (non-alcohol users and ≤ 1 sexual partner) when compared with the *PARP-1* TT genotype in the control group (Table III). Additionally, comparison between the control group and CIN subtypes (CIN I and CIN II/III) showed that CIN I patients had a low frequency of the *PARP-1* TC genotype compared with the *PARP-1* TT genotype of control group among patients with ≤ 1 sexual partner/year ($p = 0.010$, OR = 0.331, CI = 0.139 - 0.789).

Table III. Frequency distributions and statistical analysis of PARP-1 (T40676C) genotypes associated with socio-epidemiological aspects in CIN positive patients compared with control patients.

<i>PARP-1</i> T40676C	Alcohol use	Control	CIN (+)	<i>p</i>	OR (95% CI)
		N = 124 (%)	N = 75 (%)		
TT	Non	41 (50)	32 (65.3)		1 ^{ref}
TC	Non	41 (50)	15 (30.6)	*0.046	0.468 (0.202 < 0.993)
CC	Non	0 (0)	2 (4.1)	0.202	Undefined
TT	Yes	12 (28.6)	10 (38.5)		1 ^{ref}
TC	Yes	27 (64.3)	15 (57.7)	0.448	0.675 (0.233 < 1.905)
CC	Yes	3 (7.1)	1 (3.8)	0.613	0.400 (0.035 < 4.470)
<hr/>					
	Smoking Status	Control	CIN (+)	<i>p</i>	OR (95%CI)
		N = 127 (%)	N = 74 (%)		
TT	Non smoker	49 (43.4)	40 (57.1)		1 ^{ref}
TC	Non smoker	61 (54)	27 (38.6)	0.050	0.542 (0.292 < 1.004)
CC	Non smoker	3 (2.6)	3 (4.3)	1	1.225 (0.234 < 6.403)
TT	Active smoker	6 (42.9)	2 (50)		1 ^{ref}
TC	Active smoker	8 (57.1)	2 (50)	1	0.750 (0.080 < 6.953)
CC	Active smoker	0 (0)	0 (0)	0.011	(Undefined)
<hr/>					
	Start of Sexual Life	Control	CIN (+)	<i>p</i>	OR (95% CI)
		N = 124 (%)	N = 73 (%)		
TT	≤ 18 years	43 (44.8)	26 (56.5)		1 ^{ref}
TC	≤ 18 years	52 (54.2)	18 (39.1)	0.129	0.572 (0.277 < 1.187)
CC	≤ 18 years	1 (1)	2 (4.4)	0.555	3.307 (0.285 < 38.307)
TT	> 18 years	11 (39.3)	15 (55.6)		1 ^{ref}
TC	> 18 years	15 (53.6)	11 (40.7)	0.267	0.537 (0.179 < 1.616)
CC	> 18 years	2 (7.1)	1 (3.7)	0.573	0.366(0.029 < 4.572)
<hr/>					
	N° of sexual partners per year	Control	CIN (+)	<i>p</i>	OR (95% CI)
		N = 124 (%)	N = 75 (%)		
TT	≤ 1 partners	44 (44.9)	34 (79.1)		1 ^{ref}
TC	≤ 1 partners	52 (53.1)	9 (20.9)	*0.000	0.224 (0.097 < 0.517)
CC	≤ 1 partners	2 (2)	0 (0)	0.505	0.000 (Undefined)
TT	> 1 partners	10 (38.5)	3 (17.6)		1 ^{ref}
TC	> 1 partners	15 (57.7)	11 (64.8)	0.303	2.444 (0.541 < 11.028)
CC	> 1 partners	1 (3.8)	3 (17.6)	0.098	10.000 (0.738 < 135.333)

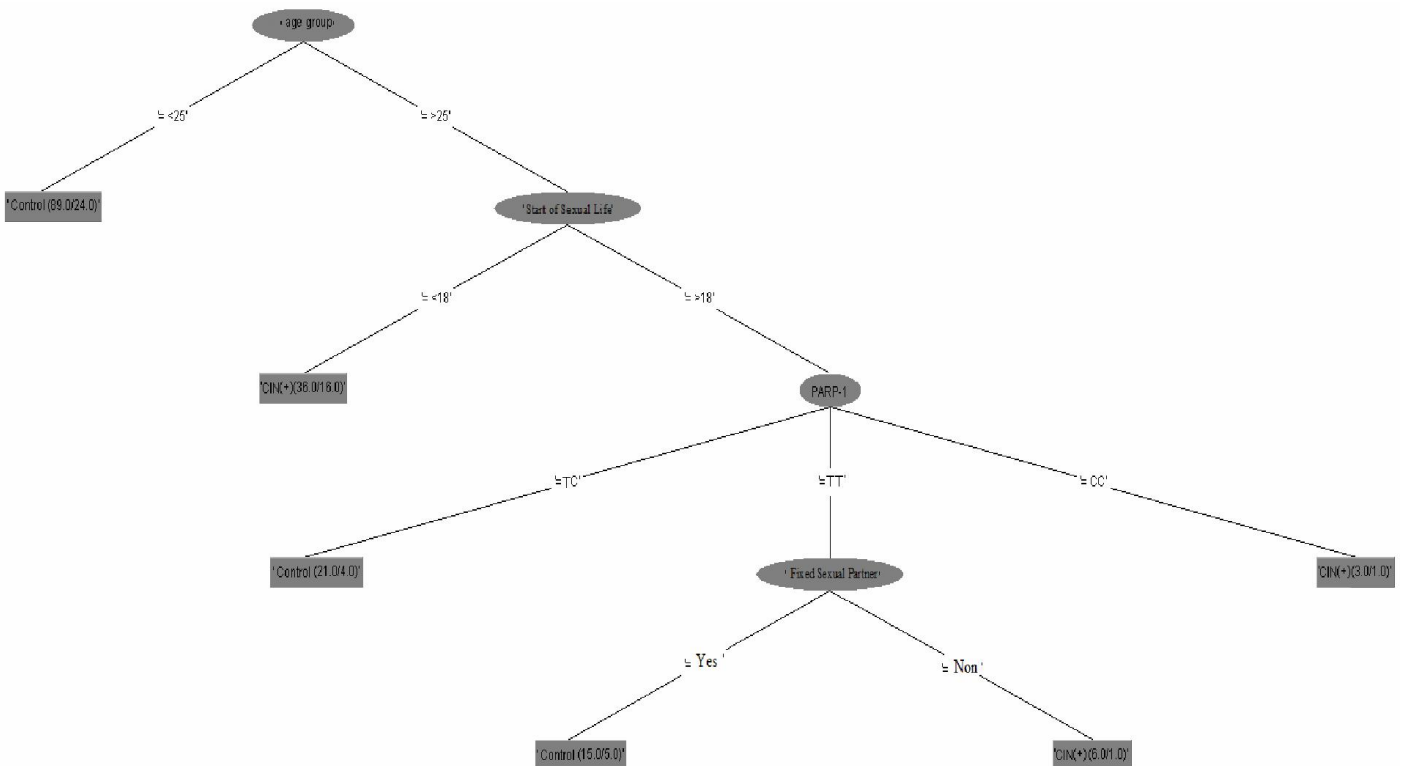
N: number of patients. * Chi-squared test., OR: odds ratio, 95% CI: confidence interval.
 $p \leq 0.05$.

Statistical analysis of Data Mining Book risk considering APE-1 and PARP-1 SNPs with socio-epidemiological in patients CIN(+) and control

Data Mining is a program what defines through automated process of capture and analysis of large data sets to extract meaning, being used both to describe the past as to predict characteristics for the future trends using some methodologies like the decision tree which identify at nodes the risk of different levels ²⁸.

The Figure IV shows the analysis considering the investigated genetic variants and environmental risk factors. The final tree contained four nodes. The first split of the node was the patients age (cutoff 25 years old), indicating that it is the strongest risk factor for the cervical lesion development among the factors considered. The following node with patients over 25 years the split was the beginning of sexual life (< 18 and > 18 years). The group of patients who sexually active before 18 age was associated with the development of cervical injury while that began after 18 age gave rise to a third node associated with the *PARP-1* genotype. In this node, the heterozygous (TC) genotype was associated with the control group and the polymorphic homozygous (CC) genotype was associated with CIN (+). The wild homozygous genotype (TT) gave rise the fourth node of this analysis in which lacked of fixed partners was considered an important factor for the development of cervical lesions.

Table IV. Statistical analysis of Data Mining Book



DISCUSSION

DNA repair pathways exist in organisms for maintaining genome integrity, so interindividual variations in DNA repair proteins, which potentially modify their functions, can result in cancer susceptibility. However, genetic susceptibility is also dependent on environmental factors to which a population is constantly exposed. The cervical carcinogenesis is dependent of HPV, detected in almost all tumors (ranging from 72% to 99%) using molecular biology approach^{29,30,31}. The Cervical intraepithelial neoplasia is the first clinical evidence of cervical alteration. Therefore, studies on precursor lesions are relevant and should be informative about the genetic risk and the relationship with environmental risk factors as early onset of sexual life as well as multiple sexual partners the use of tobacco and alcohol^{32, 33, 34, 35}.

Only a few studies have addressed the polymorphisms of repair enzymes in cervical intraepithelial neoplasia disease, including polymorphisms of the base excision repair (BER) pathway genes, *APE-1* Asp148Glu (T2197G) and *PARP-1* Val762Ala (T40676C). The Maternity School Cervical Pathology Service in which the cervical intraepithelial neoplasia cases were collected is a public hospital located in the Northeast Brazil, in which the majority of the patients are with low income and education. The specific ambulatory service, focus mainly young women bringing the opportunity to understanding the importance of the risk factor in this group of patients and justify the lower median age found in this study for the CIN positive patients (28 years old) than the other studies^{24, 25, 26}.

In this study, no risk was observed for both polymorphism studied. Similarly, Ye et al (2012) and Zhang et al (2012), in their studies with Chinese patients, did not find any association between *PARP-1* T>C genotypes and CIN development. Taking in account the studies with cervical cancer, they were conflicting. Roszak et al (2013) in study with Polish patients and in Ye et al (2012) study, in the same above cited study, found a risk associated with the *PARP-1* polymorphic allele (C) and CC genotype, respectively. In contrast, Zhang et al (2012) study, which included only squamous cell carcinoma, also in a Chinese population, didn't find any association. When CIN categories were considered, unlike Ye et al (2012) study, we found a significantly lower frequency of the *PARP-1* TC genotype associated with CIN I patients, which is considered, in general, a lesion with low risk for cervical cancer development.

At the time of writing, no study was found in the literature regarding the

importance of the *APE-1* T>G polymorphism in cervical intraepithelial lesions or cervical cancer. Considering other types of cancer the risk for this polymorphism is a controversial issue even for the same tumor, as shown for colorectal and prostate cancer^{20, 36, 37, 38}. In general, the ethnic background of the population studied, where the frequencies of the polymorphic allele vary around the world, could explain these differences. In the population studied, the frequency of 33.8% for *APE-1* polymorphic allele in the control population was higher compared to African Americans (26.6%) but lower compared to Europeans (50%) and Asians (35 to 45%) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>].

Since genetic polymorphisms are considered low-penetrance genes, the combination of genes from the same pathway are important as well as the risk factors. Epidemiological risk factors for the development of carcinoma of the cervix include the early onset of sexual life and multiple sexual partners³⁹, which results in more exposure to viral infection and consequently DNA damage⁴⁰. Additionally, smoking and alcohol use are also associated with DNA damage and susceptibility to different cancers.

The analysis considering the above-mentioned risk factors, only *PARP-1* T>C genotypes gave significant results. A protection against CIN development was demonstrated among the patients who did not drink alcohol and carried the TC genotype, suggesting an efficient DNA repair in the heterozygous condition in the absence of alcohol exposure. The only study that examined alcohol consumption was that of Zhang et al (2012), who also found no significant association.

Considering the number of partners/year, our findings showed that the *PARP-1* TC genotype was associated with CIN protection development in patients with ≤ 1 partner/year. Also, when analyzing CIN subtypes, this protection was observed for CIN I patients carrying the TC genotype with ≤ 1 partners/year. Different from our findings, Zhang et al (2012) and Ye et al (2012) did not note any statistical association with number of partners for CIN development, although several studies have reported in the literature that the number of sexual partners is directly related disease progression^{41,42}.

The *PARP-1* T>C polymorphic allele frequencies vary widely in different populations [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>], for Asians, the range is 12 to 50%, compared to 15% for Europeans, and African Americans have a low rate of 4%. In our study, the frequency of this allele (28.3%) was similar to that of Sub-Saharan Africans (23%). Given the genetic variation found within the same region such Asia, it seems that studies need to take in consideration the frequency of the polymorphic allele and

homozygous polymorphic genotype to determine the importance of this polymorphism for cancer risk in the population studied.

The data was also analyzed by the Data Mining Book program. This is a tool used for analyze the interaction between polymorphism and risk factors for complex multifactorial common diseases as cervical neoplasia, where the interpretation of the interactions between genetic and environment is a big challenge⁴³. The results of this analysis showed that age (>25 years) was the main risk factor for patients. Patients who were >25 years and began their sexual life before 18 years were related to the development of CIN(+). These data are according to the literature where it is known that the appearance of these lesions is more common in older patients due to virus incubation and maturation time (zur Hausen, 1999) and the early start of life sexual, which give more chances for HPV infection also. Additionally, it is during adolescence that the acidification of the vaginal pH induces the replacement of a part of the endocervical epithelium by a metaplastic squamous epithelium, known as the transformation zone (TZ). It is in this zone that more than 90% of cervical cancer It happens⁴⁴. Recently, Herfs et al. (2012) showed that in the squamocolumnar junction of the cervix, a discrete population of cells could be responsible for the HPV-associated cervical carcinoma.

The interaction between the studied repair enzymes was observed only in the third node and just with *PARP-1* confirming the previous results. In this node the polymorphic homozygote genotype (CC) was associated with CIN(+) patients, who began their sexual life after 18 years, the heterozygous genotype (CT) was associated with the control group. This result agree in certain way with our previous analysis, where the CT genotype was associated to a protection with more specifically CIN I lesion, which are the more benign lesion, justifying therefore this genotype associated to control group. The relevance of the risk factor could be observed in the next node where the wild homozygous genotype (TT) was associated with the development of CIN(+) when considering patients with not fixed sexual partners.

In summary, this study it was possible to verify by different analysis the relevance of the risk factors as age, and suggest that the efficiency of DNA repair involving *PARP-1* is a balance between genotype and exposure to risk factors such as number of partners, where the efficiency of the heterozygous genotype for DNA repair is dependent on risk exposure. This study contributes to our understanding of the association between *PARP-1* Val762Ala (T40676C) polymorphism and CIN and is the

first to include the *APE-1* Asp148Glu (T2197G) polymorphism in such a CIN study. Complementary study with cervical cancer, beyond CIN lesions, will import to define if a risk will be associated to *PARP-1* CC genotype in the population studied.

CONFLICT OF INTEREST

All authors declare no conflict of interest that could inappropriately influence this work.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 402694/2008-2 for financial support.

REFERENCES

- [1]. WHO- World Health Organization Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/> Accessed Nov 2013.
- [2]. INCA- Instituto Nacional de Câncer Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero Estimativa 2012 - Incidência de Câncer no Brasil In: <http://www2.inca.gov.br/> Accessed Dez 2013.
- [3]. Zur Hausen, H (1999) Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Semin, Cancer Biol* 9:405–411.
- [4]. Dunne EF & Park IU (2013) HPV and HPV-associated diseases *Infect Dis Clin North Am Dec*, 27(4):765-78 DOI: 10.1016/j.idc.2013.09.001.
- [5]. Feller L, Wood NH, Khammissa RAG, Lemmer J (2010) Human Papillomavirus-Mediated Carcinogenesis And Hpv-Associated Oral And Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Part 1: Human papillomavirus-mediated carcinogenesis. *Head & Face Medicine* 6:14.
- [6]. Pim D, Banks L (2010) Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *APMIS v* 118, 471-493.
- [7]. Freitas AC, Gurgel APAD, Chagas BS, Coimbra EC, Amaral CMM (2012) Susceptibility to cervical cancer: An overview. *Gynecologic Oncology* 126 304–311.
- [8]. Kang SK, Lee KK, Lee W, Shiw JY, Ji SI et al (2007) Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 associated with basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin in a Korean population. *Cancer Sci* 98: 716-712.
- [9]. Karahalil B, Bohr VA, Wilson III DM (2012) Impact of DNA polymorphisms in key DNA base excision repair proteins on cancer risk Human and Experimental. *Toxicology* 31(10) 981-1005.
- [10]. Chen W, Wang Q, Liu M, Ding X (2013) The association of APE1 Asp148Glu gene polymorphisms and lung cancer risk: an updated meta-analysis. *Tumor Biol* DOI 10.1007/s13277-013-1474-8.
- [11]. Tell G, Quadrioglio F, Tiribelli C, Kelley MR (2009) The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme. *Antioxidants & redox signaling*, 11(3), 601–20 DOI: 10.1089/ars.2008.2194.
- [12]. UCSC - Genome Bioinformatics Disponível em: <http://genome.ucsc.edu/> Accessed Nov 2013.
- [13]. GENECARDS V3- The Human Gene Compendium <http://www.genecards.org/> Accessed Nov 2013.

- [14]. Beneke S (2012) Regulation of chromatin structure by poly(ADP-ribosyl)ation. *Frontiers in Genetics* DOI: 103389/fgene201200169.
- [15]. Peralta-Leal A, Rodríguez-Vargas JM, Aguilar-Quesada R, Rodríguez MI, Linares JL et al (2009) PARP inhibitors: New partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, 47: 13–26. DOI: 101016/j.freeradbiomed2009 04008.
- [16]. Bai P & Canto C (2012) The Role of PARP-1 and PARP-2 Enzymes in Metabolic Regulation and Disease. *Cell Metabolism* <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.016>.
- [17]. Attar R, Cacina C, Sozen S, Attar E, Agachan B (2010) DNA repair genes in endometriosis. *Genet Mol Rev* 9: 629-636.
- [18]. Li Y, Li S, Wu Z, Hu F, Zhu L et al (2013) Polymorphisms in genes of APE1, PARP1, and XRCC1: risk and prognosis of colorectal cancer in a northeast Chinese population. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 30(2), 505 DOI:101007/s12032-013-0505-z.
- [19]. Agaçhan B, Küçüküseyin O, Aksoy P, Turna A, Yaylim I, Görmüs U, et al (2009) Apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1) gene polymorphisms and lung cancer risk in relation to tobacco smoking. *Anticancer Res* 29: 2417-20.
- [20]. Mandal RK, Gangwar R, Kapoor R, Mittal RD (2012) Polymorphisms in base-excision & nucleotide-excision repair genes & prostate cancer risk in north Indian population. *Indian J Med Res* 135: 64-71.
- [21]. Jarosz M, Sekula W, Rychlik E (2013) Trends in Dietary Patterns, Alcohol Intake, Tobacco Smoking, and Colorectal Cancer in Polish Population in 1960–2008. Hindawi Publishing Corporation *BioMed Research International* Article ID 183204, 10 pag <http://dxdoiorg/101155/2013/183204>.
- [22]. Lockett KL, Hall MC, Xu J, Zheng S L, Berwick M et al (2004) The ADPRT V762A genetic variant contributes to prostate cancer susceptibility and deficient enzyme function. *Cancer research* 64 (17), 6344–8 DOI: 101158/0008-5472 CAN-04-0338.
- [23]. Alanazi M, Pathan AAK, Arifeen Z, Shaik JP, Alabdulkarim HA, (2013) Association between PARP-1 V762A Polymorphism and Breast Cancer Susceptibility in Saudi. Population. *PloS One*, 8(12), e85541 :101371/journalpone0085541.
- [24]. Ye F, Cheng Q, Hu Y, Zhang JING, Chen H (2012) PARP-1 Val762Ala Polymorphism is Associated with Risk of Cervical Carcinoma. *PLoS One* 7(5): e37446. DOI: 101371/journalpone0037446.
- [25]. Zhang L, Ruan Z, Hu Z, Huang Y, Xu A et al (2012) Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and risk of cervical cancer: A case-control study. *Oncology Letters* 3: 351-362.

- [26]. Roszak A, Lianeri M, Sowin'ska A, Jagodzin'ski PP (2013) Involvement of PARP-1Val762Ala Polymorphism in the onset of cervical cancer in caucasian women. *Mol Diagn Ther* 17:239–245 DOI: 101007/s40291-013-0036-5.
- [27]. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, et al (2002) The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287(16):2114-9.
- [28]. Sferra, H.H.; Correa, Â.M.C. Jorge. Conceitos e Aplicações de Data Mining. Jul/Dez de 2003, *Revista Ciência & Tecnologia*, PP. 19-34.
- [29]. Discacciati M.G, da Silva I.D.C.G, Villa L.L, REIS L, Hayashi P, Costa M.C, Rabelo-Santos S.H, Zeferino L.C (2014) Prognostic Value of DNA and mRNA E6/E7 of human Papillomavirus in the evolution of Cervical intraepithelial neoplasia grade 2. *Biomarker Insights*. 9 15–22 DOI: 10.4137/Bmi.s14296.
- [30]. Vidal A.C, Smith J.S, Valea F, Bentley R, Gradison M et al (2014) HPV genotypes and cervical intraepithelial neoplasia in a multiethnic cohort in the southeastern USA. *Cancer Causes Control*. DOI: 10.1007/s10552-014-0406-2.
- [31]. Freitas, T.P, Carmo, B.B, Paula, F.D.F, Rodrigues, L.F, Fernandes, A.P. Fernandes, P.A (2007) Molecular detection of HPV 16 and 18 in cervical samples of patients from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 49(5): 297-301.
- [32]. Moscicki, AB (2007) HPV infections in adolescents. *Disease Markers* 23. pp-229–234 IOS Press.
- [33]. Stanley, M (2009) Early age of sexual debut: a risky experience. ©FSRH *J Fam Plann Reprod Health Care* 35(2).
- [34]. Urashima M, Hama T, Suda T, Suzuki Y, Ikegami, M (2013) Distinct Effects of Alcohol Consumption and Smoking on Genetic Alterations in Head and Neck Carcinoma. *PLoS One* 8(11): e80828. DOI: 101371/journalpone0080828.
- [35]. Laffoy M, Carthy TMC, Mullen L, Byrne D, Martin J (2013) Cancer incidence and mortality due to alcohol: An analysis of 10-year data. *Irish Medical Journal*, Vol 106, No 10, Nov/Dec, pp 1-3.
- [36]. Chen L, Ambrosone CB, Lee J, Sellers TA, Pow-Sang J, et al (2006) Association Between Polymorphisms in the DNA Repair Genes XRCC1 and APE1, and the risk of Prostate cancer in white and black americans. *The Journal Of Urology®* Vol 175, 108-112, January Printed in USA DOI: 101016/S0022-5347(05)00042-X.
- [37]. Gu D, Wang M, Wang M, Zhang Z, Chen J (2009) The DNA repair gene APE1 T1349G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 27 case-control studies. *Mutagenesis* 24: 507–12.

- [38]. Shen E, Liu C, Wei L, Hu J, Weng J, et al (2013) The APE1 Asp148Glu polymorphism and colorectal cancer susceptibility: a meta-analysis. *Tumor Biol* 101007/s13277-013-1334-6.
- [39]. Shekari M, Cannistra SA, Niloff JM (1996) Cancer of the uterine cervix. *N Engl J Med*, 334, 1030–1038.
- [40]. Lee D, Kim JW, Kim K, Joe CO, Schreiber V et al (2002) Functional interaction between Human Papillomavirus type 18 E2 and Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1. *Oncogene* 21,5877 – 5885 Nature Publishing Group All rights reserved 0950 – 9232/02.
- [41]. Kjaer SK, De Villiers EM, Dahl C, Engholm G, Bock JE, Vestergaard BF, et al. Case-control study of risk factors for cervical neoplasia in Denmark. Role of the 'male factor' in women with one lifetime sexual partner. *Int J Cancer* 48 : 39-44. (1991).
- [42]. Ghittoni, R.; Accardi, R.; Chiocca, S.; Tommasino, M. Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. *Ecancermedicalsecience*. 9: 526. DOI: 10.3332/ecancer.2015.526. (2015).
- [43]. Haiyan, C.; Meilin, W.; Zhengdong Z.B. Cancer epidemiology and genetic susceptibility. *J Biomed Research*. May; 27(3): 170–178. DOI: 10.7555/JBR.27.20130026. (2013).
- [44]. Martens, J.E.; Smedts, F.M.; Ploeger, D.; Helmerhorst, T.J.; Ramaekers, F.C.; Arends, J.W.; Hopman, A.H. Distribution pattern and marker profile show two subpopulations of reserve cells in the endocervical canal. *Int J Gynecol Pathol* 28:381–388. (2009).
- [45]. Herfs, M.; Yamamoto, Y.; Laury, A.; Wang, X.; Nucci, M.R.; Mclaughlin-Drubin, M.E.; Feldman, S.; Mckee, F.D.; Xian, W.; Crum, C.P.A. Discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26), 10516–21. doi:10.1073/pnas.1202684109. (2012).

APÊNDICE II - TABELAS COMPLEMENTARES

TABELA I- a

Fatores Sócio- epidemiológicos										
Faixa Etária	Estado Civil		Álcool		Fumo		IVS		Nº parceiros/ano	
	Solteira N (%)	Casada N (%)	Não N (%)	Sim N (%)	Não N (%)	Sim N (%)	≤ 18 anos N (%)	>18 anos N (%)	≤ 1 N (%)	>1 N (%)
14- 20 anos	50 (48.1)	24 (26.1)	51 (39)	25 (36.8)	70 (38.3)	7 (38.9)	76 (49)	0 (0)	53 (35.6)	18 (41.9)
21- 30 anos	35 (33.7)	27 (29.4)	39 (30)	23 (33.7)	57 (31.1)	5 (27.8)	45 (29)	17 (40.5)	45 (30.2)	17 (39.5)
31-40 anos	12 (11.5)	28 (30.4)	26 (20)	16 (23.5)	37 (20.2)	5 (27.8)	25 (16.2)	15 (35.7)	33 (22.1)	7 (16.3)
41- 50 anos	7 (6,7)	13 (14.1)	15 (11)	4 (6)	19 (10.4)	1 (5.5)	9 (5.8)	10 (23.8)	18 (12.1)	1 (2.3)
Total	104	92	131	68	183	18	155	42	149	43

IVS: Início de vida sexual

TABELA I- b

Fatores Clínico-epidemiológicos						
Faixa Etária	Control	NIC (-)	NIC (+)	NIC I	NIC II	NIC III
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
14- 20 anos	48 (48.5)	9 (31.1)	20 (26.7)	16 (32)	4 (21.1)	0 (0)
21- 30 anos	29 (29.3)	7 (24.1)	28 (37.3)	17 (34)	9 (47.4)	2 (33.3)
31-40 anos	13 (13.1)	7 (24.1)	22 (29.3)	14 (28)	4 (21.1)	4 (66.7)
41- 50 anos	9 (9.1)	6 (20.7)	5 (6.7)	3 (6)	2 (10.4)	0 (0)
Total	99	29	75	50	19	6

TABELA I- c

Associação dos genótipos dos genes de reparo com os fatores clínico das pacientes							
	APE-1			Total	PARP-1		
	TT	TG	GG		TT	TC	CC
Control	42 (42.4)	47 (47.5)	10 (10.1)	99	43 ()	56 ()	0 (0)
NIC (-)	11 (37.9)	14 (48.3)	4 (13.8)	29	12 (41.4)	14 (48.3)	3 (10.3)
NIC (+)	36 (48)	31 (41.3)	8 (10.7)	75	42 (56)	30 (40)	3 (4)
NIC I	23 (46)	21 (42)	6 (12)	50	29 (58)	18 (36)	13 (26)
NIC II	9 (47.4)	8 (42.1)	2 (10.5)	19	11 (57.9)	8 (42.1)	0 (0)
NIC III	4 (66.7)	2 (33.3)	0 (0)	6	2 (33.3)	4 (66.7)	0 (0)

TABELA II- b
(Continuação da tabela II do artigo)

APE-1	PARP-1	CONTROLE		NIC (+)		<i>p</i>	OR (CI)
		N	%	N	%		
TT	TT	18	42,90%	19	52,80%		1 ^{ref}
	TC	24	57,10%	15	41,70%	0.258	0.592 (0.237 < 1.474)
	CC	0	0,00%	2	5,60%	0.489	Undefined
TG	TT	19	40,40%	16	51,60%		1 ^{ref}
	TC	28	59,60%	14	45,20%	0.267	0.593 (0.235 < 1.496)
	CC	0	0,00%	1	3,20%	0.472	Undefined
GG	TT	6	60,00%	7	87,50%		1 ^{ref}
	TC	4	40,00%	1	12,50%	0.313	0.214 (0.018 < 2.477)
	CC	0	0,00%	0	0,00%	0.102	0.000 (Undefined)

APE-1	PARP-1	CONTROLE		NIC I		<i>p</i>	OR (CI)
		N	%	N	%		
TT	TT	18	42,90%	13	56,50%		1 ^{ref}
	TC	24	57,10%	8	34,80%	0.153	0.461 (0.158 < 1.348)
	CC	0	0,00%	2	8,70%	0.198	Undefined
TG	TT	19	40,40%	11	52,40%		1 ^{ref}
	TC	28	59,60%	9	42,90%	0.272	0.555 (0.193 < 1.596)
	CC	0	0,00%	1	4,80%	0.387	Undefined
GG	TT	6	60,00%	5	83,30%		1 ^{ref}
	TC	4	40,00%	1	16,70%	0.587	0.300 (0.024 < 3.626)
	CC	0	0,00%	0	0,00%	0.230	0.000 (Undefined)

APE-1	PARP-1	CONTROLE		NIC II/III		<i>p</i>	OR (CI)
		N	%	N	%		
TT	TT	18	42,90%	6	46,20%		1 ^{ref}
	TC	24	57,10%	7	53,80%	1	0.875 (0.250 < 3.054)
	CC	0	0,00%	0	0,00%	1	0.000 (Undefined)
TG	TT	19	40,40%	5	50,00%		1 ^{ref}
	TC	28	59,60%	5	50,00%	0.727	0.678 (0.172 < 2.669)
	CC	0	0,00%	0	0,00%	1	0.000 (Undefined)
GG	TT	6	60,00%	2	100,00%		1 ^{ref}
	TC	4	40,00%	0	0,00%	0.515	0.000 (Undefined)
	CC	0	0,00%	0	0,00%	-	0.000 (Undefined)

N: number of patients.

* Chi-squared test., OR: odds ratio, 95% CI: confidence interval. $p \leq 0.05$.

APE-1	PARP-1	NIC (-)		NIC (+)		<i>p</i>	OR (CI)
		N	%	N	%		
TT	TT	5	45,50%	19	52,80%	0.252	1 ^{ref}
	TC	4	36,40%	15	41,70%		0.986 (0.224 < 4.330)
	CC	2	18,20%	2	5,60%		0.263 (0.029 < 2.360)
TG	TT	4	28,60%	16	51,60%	0.202	1 ^{ref}
	TC	9	64,30%	14	45,20%		0.388 (0.097 < 1.544)
	CC	1	7,10%	1	3,20%		0.411 0.250 (0.012 < 4.924)
GG	TT	3	75,00%	7	87,50%	0.363	1 ^{ref}
	TC	1	25,00%	1	12,50%		0.428 (0.019 < 9.364)
	CC	0	0,00%	0	0,00%		0.000 (Undefined)

APE-1	PARP-1	NIC (-)		NIC I		<i>p</i>	OR (CI)
		N	%	N	%		
TT	TT	5	45,50%	13	56,50%	0.564	1 ^{ref}
	TC	4	36,40%	8	34,80%		0.769 (0.158 < 3.744)
	CC	2	18,20%	2	8,70%		0.384 (0.042 < 3.523)
TG	TT	4	28,60%	11	52,40%	0.284	1 ^{ref}
	TC	9	64,30%	9	42,90%		0.363 (0.083 < 1.582)
	CC	1	7,10%	1	4,80%		0.514 0.363 (0.018 < 7.295)
GG	TT	3	75,00%	5	83,30%	0.444	1 ^{ref}
	TC	1	25,00%	1	16,70%		0.600 (0.026 < 13.582)
	CC	0	0,00%	0	0,00%		0.000 (Undefined)

APE-1	PARP-1	NIC (-)		NIC II/III		<i>p</i>	OR (CI)
		N	%	N	%		
TT	TT	5	45,50%	6	46,20%	0.461	1 ^{ref}
	TC	4	36,40%	7	53,80%		1.458 (0.264 < 8.048)
	CC	2	18,20%	0	0,00%		0.000 (Undefined)
TG	TT	4	28,60%	5	50,00%	0.417	1 ^{ref}
	TC	9	64,30%	5	50,00%		0.444 (0.080 < 2.457)
	CC	1	7,10%	0	0,00%		0.000 (Undefined)
GG	TT	3	75,00%	2	100,00%	1	1 ^{ref}
	TC	1	25,00%	0	0,00%		0.000 (Undefined)
	CC	0	0,00%	0	0,00%		0.000 (Undefined)

N: number of patients.

* Chi-squared test., OR: odds ratio, 95% CI: confidence interval. $p \leq 0.05$.

TABELA III- b
(Continuação da tabela III do artigo)

<i>PARP-1</i> (A40676G)	Alcohol	Control N = 95 (%)	CIN (+) N = 75 (%)	<i>p</i>	OR (CI)
TT	NON	32 (33,7%)	32 (42,7%)		1 ^{ref}
TC	NON	34 (35,8%)	15 (20%)		
CC	NON	0 (0%)	2 (2,7%)		
TT	YES	9 (9,5%)	10 (13,3%)	0.840	1.111 (0.398 - 3.097)
TC	YES	20 (21%)	15 (20%)	0.496	0.750 (0.327 - 1.719)
CC	YES	0 (0%)	1 (1,3%)	1	Undefined
	Smoking Status	Control N = 98(%)	CIN (+) N = 74 (%)	<i>p</i>	OR (CI)
TT	Non smoker	41 (41,8%)	x		1 ^{ref}
TC	Non smoker	48 (49%)	27 (36,5%)		
CC	Non smoker	0 (0%)	3 (4%)		
TT	Active smoker	2 (2%)	2 (2,7%)	1	1.025 (0.137 - 7.633)
TC	Active smoker	7 (7,2%)	2 (2,7%)	0.166	0.292 (0.057 - 1.495)
CC	Active smoker	0 (0%)	0 (0%)	0.014	0.000 (Undefined)
	Start of Sexual Life	Control N = 96 (%)	CIN (+) N = 73 (%)	<i>p</i>	OR (CI)
TT	≤ 18 years	27 (28%)	26 (35,6%)		1 ^{ref}
TC	≤ 18 years	41 (42,7%)	18 (24,7%)		
CC	≤ 18 years	0 (0%)	2 (2,7%)		
TT	> 18 years	16 (16,7%)	15 (20,5%)	0.952	0.973 (0.401 - 2.362)
TC	> 18 years	12 (12,5%)	11 (15,1%)	0.921	0.951 (0.357 - 2.535)
CC	> 18 years	0 (0%)	1 (1,4%)	1	Undefined
	N° of sexual partners per year	Control N = 99 (%)	CIN (+) N = 75 (%)	<i>p</i>	OR (CI)
TT	≤ 1 partners	39 (41,1%)	34 (56,7%)		1 ^{ref}
TC	≤ 1 partners	39 (41,1%)	9 (15%)		
CC	≤ 1 partners	0 (0%)	0 (0%)		
TT	> 1 partners	3 (3,1%)	3 (5%)	1	1.147 (0.217 - 6.063)
TC	> 1 partners	14 (14,7%)	11 (18,3%)	0.823	0.901 (0.361 - 2.247)
CC	> 1 partners	0 (0%)	3 (5%)	0.110	Undefined

N: number of patients.

* Chi-squared test., OR: odds ratio, 95% CI: confidence interval. $p \leq 0.05$.

TABELA IV- b
(Continuação da tabela IV do artigo)

<i>PARP-1</i> (A40676G)	Alcohol	NIC (-)	NIC (+)	<i>p</i>	OR (CI)
		N = 29 (%)	N = 75 (%)		
TT	NON	9 (31%)	32 (42,7%)		1 ^{ref}
TC	NON	7 (24,2%)	15 (20%)		
CC	NON	0 (0%)	2 (2,7%)		
TT	YES	3 (10,3%)	10 (13,3%)	1	0.937 (0.211 - 4.147)
TC	YES	7 (24,2%)	15 (20%)	0.391	0.602 (0.188 - 1.927)
CC	YES	3 (10,3%)	1 (1,3%)	0.052*¹	0.093 (0.008 - 1.013)
		NIC (-)	NIC (+)	<i>p</i>	OR (CI)
Smoking Status		N = 29 (%)	N = 74 (%)		
TT	Non smoker	8 (27,6%)	40 (54,1%)		1 ^{ref}
TC	Non smoker	13 (44,8%)	27 (36,5%)		
CC	Non smoker	3 (10,3%)	3 (4%)		
TT	Active smoker	4 (13,8%)	2 (2,7%)	0.017*	0.100 (0.015 - 0.642)
TC	Active smoker	1 (3,5%)	2 (2,7%)	0.448	0.400 (0.032 - 4.959)
CC	Active smoker	0 (0%)	0 (0%)	0.183	0.000 (Undefined)
		NIC (-)	NIC (+)	<i>p</i>	OR (CI)
IVS		N = 28 (%)	N = 73 (%)		
TT	≤ 18 years	6 (21,4%)	26 (35,6%)		1 ^{ref}
TC	≤ 18 years	7 (25%)	18 (24,7%)		
CC	≤ 18 years	1 (3,6%)	2 (2,7%)		
TT	> 18 years	5 (17,9%)	15 (20,5%)	0.730	0.692 (0.180 - 2.660)
TC	> 18 years	7 (25%)	11 (15,1%)	0.119	0.362 (0.099 - 1.328)
CC	> 18 years	2 (7,1%)	1 (1,4%)	0.124	0.115 (0.008 - 1.491)
		NIC (-)	NIC (+)	<i>p</i>	OR (CI)
N° of sexual partners per year		N = 29 (%)	N = 75 (%)		
TT	≤ 1 partners	5 (17,2%)	34 (56,7%)		1 ^{ref}
TC	≤ 1 partners	13 (44,8%)	9 (15%)		
CC	≤ 1 partners	2 (6,9%)	0 (0%)		
TT	> 1 partners	7 (24,1%)	3 (5%)	0.000*	0.063 (0.0121 - 0.327)
TC	> 1 partners	1 (3,5%)	11 (18,3%)	1	1.617 (0.170 - 15.380)
CC	> 1 partners	1 (3,5%)	3 (5%)	0.464	0.441 (0.038 - 5.113)

N: number of patients.

* Chi-squared test., OR: odds ratio, 95% CI: confidence interval. $p \leq 0.05$.

¹: A estatística não foi considerada devido ao CI.

TABELA V- a

<i>PARP-1 (A40676G)</i>		Control N = 95 (%)	NIC I N = 50 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	NIC II / III N = 25 (%)	<i>p</i>	OR (CI)
TT	NON	32 (48,5%)	23 (63,9)		1 ^{ref}	9 (69,2)		1 ^{ref}
TC	NON	34 (51,5%)	11 (30,6)	0,068	0,450 (0,189 - 1,069)	4 (30,8)	0,229	0,418 (0,117 - 1,493)
CC	NON	0 (0%)	2 (5,5)	0,187	Undefined	0 (0)	1	0,000 (Undefined)
TT	YES	9 (31%)	6 (42,9)		1 ^{ref}	4 (33,3)		1 ^{ref}
TC	YES	20 (69%)	7 (50)	0,344	0,525 (0,136 - 2,014)	8 (66,7)	1	0,900 (0,214 - 3,780)
CC	YES	0 (0%)	1 (7,1)	0,437	Undefined	0 (0)	0,017	0,000 (Undefined)
Smoking Status		Control N = 98(%)	NIC I N = 49 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	NIC II / III N = 25 (%)	<i>p</i>	OR (CI)
TT	Non smoker	41 (46,1%)	28 (58,3)		1 ^{ref}	12 (54,5)		1 ^{ref}
TC	Non smoker	48 (53,9%)	17 (35,4)	0,077	0,518 (0,249 - 1,079)	10 (45,5)	0,475	0,711 (0,278 - 1,816)
CC	Non smoker	0 (0%)	3 (6,3)	0,075	Undefined	0 (0)	-	-
TT	Active smoker	2 (22,2%)	1 (100)		1 ^{ref}	1 (33,3)		1 ^{ref}
TC	Active smoker	7 (77,8%)	0 (0)	0,3	0,000 (Undefined)	2 (66,7)	1	0,571 (0,032 - 10,069)
CC	Active smoker	0 (0%)	0 (0)	-	-	0 (0)	-	-
IVS		Control N = 96 (%)	NIC I N = 49 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	NIC II / III N = 24 (%)	<i>p</i>	OR (CI)
TT	≤ 18 years	27 (39,7%)	16 (57,2)		1 ^{ref}	10 (55,6)		1 ^{ref}
TC	≤ 18 years	41 (60,3%)	10 (35,7)	0,057* ¹	0,411 (0,162 - 1,040)	8 (44,4)	0,227	0,526 (0,184 - 1,503)
CC	≤ 18 years	0 (0%)	2 (7,1)	0,154	Undefined	0 (0)	-	-
TT	> 18 years	16 (57,1%)	13 (61,9)		1 ^{ref}	2 (33,3)		1 ^{ref}
TC	> 18 years	12 (42,9%)	7 (33,3)	0,583	0,717 (0,219 - 2,348)	4 (66,7)	0,387	2,666 (0,417 - 17,046)
CC	> 18 years	0 (0%)	1 (4,8)	0,466	Undefined	0 (0)	-	-
Nº of sexual partners per year		Control N = 99 (%)	NIC I N = 45 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	NIC II / III N = 23 (%)	<i>p</i>	OR (CI)
TT	0-1 partners	39 (50%)	23 (71,9)		1 ^{ref}	11 (57,9)		1 ^{ref}
TC	0-1 partners	39 (50%)	9 (28,1)	0,035*	0,391 (0,160 - 0,952)	8 (42,1)	0,536	0,727 (0,264 - 2,003)
CC	0-1 partners	0 (0%)	0 (0)	-	-	0 (0)	-	-
TT	> 1 partners	3 (17,6%)	2 (15,4)		1 ^{ref}	1 (25)		1 ^{ref}
TC	> 1 partners	14 (82,4%)	8 (61,5)	1	0,857 (0,117 - 6,263)	3 (75)	1	0,642 (0,048 - 8,517)
CC	> 1 partners	0 (0%)	3 (23,1)	0,196	Undefined	0 (0)	-	-

N: number of patients.

* Chi-squared test., OR: odds ratio, 95% CI: confidence interval. $p \leq 0.05$.¹: A estatística não foi considerada devido ao CI.

TABELA V- b

<i>PARP-1 (A40676G)</i>		Control	NIC I			NIC II / III		
Alcohol		N = 95 (%)	N = 50 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	N = 25 (%)	<i>p</i>	OR (CI)
TT	NON	32 (33,7%)	23 (46)		1 ^{ref}	9 (36)		1 ^{ref}
TC	NON	34 (35,8%)	11 (22)			4 (16)		
CC	NON	0 (0%)	2 (4)			0 (0)		
TT	YES	9 (9,5%)	6 (12)	0,899	0,927 (0,289 - 2,969)	4 (16)	0,710	1,580 (0,393 - 6,349)
TC	YES	20 (21%)	7 (14)	0,160	0,487 (0,176 - 1,342)	8 (32)	0,530	1,422 (0,415 - 4,290)
CC	YES	0 (0%)	1 (2)	0,428	Undefined	0 (0)	-	-
Smoking Status		Control	NIC I			NIC II / III		
		N = 98(%)	N = 49 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	N = 25 (%)	<i>p</i>	OR (CI)
TT	Non smoker	41 (41,8%)	28 (57,1)		1 ^{ref}	12 (48)		1 ^{ref}
TC	Non smoker	48 (49%)	17 (34,7)			10 (40)		
CC	Non smoker	0 (0%)	3 (6,1)			0 (0)		
TT	Active smoker	2 (2%)	1 (2)	1	0,732 (0,063 - 8,468)	1 (4)	0,554	1,708 (0,142 - 20,506)
TC	Active smoker	7 (7,2%)	0 (0)	0,042*¹	0,000 (Undefined)	2 (8)	1	0,976 (0,178 - 5,333)
CC	Active smoker	0 (0%)	0 (0)	-	-	0 (0)	-	-
IVS		Control	NIC I			NIC II / III		
		N = 96 (%)	N = 49 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	N = 24 (%)	<i>p</i>	OR (CI)
TT	≤ 18 years	27 (28%)	16 (32,6)		1 ^{ref}	10 (41,7)		1 ^{ref}
TC	≤ 18 years	41 (42,7%)	10 (20,4)			8 (33,3)		
CC	≤ 18 years	0 (0%)	2 (4,1)			0 (0)		
TT	> 18 years	16 (16,7%)	13 (26,5)	0,517	1,371 (0,526 - 3,574)	2 (8,3)	0,298	0,337 (0,065 - 1,738)
TC	> 18 years	12 (12,5%)	7 (14,3)	0,977	0,984 (0,321 - 3,012)	4 (16,7)	1	0,900 (0,234 - 3,451)
CC	> 18 years	0 (0%)	1 (2)	0,386	Undefined	0 (0)	-	-
Nº of sexual partners per year		Control	NIC I			NIC II / III		
		N = 99 (%)	N = 45 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	N = 23 (%)	<i>p</i>	OR (CI)
TT	≤ 1 partners	39 (41,1%)	23 (51,1)		1 ^{ref}	11 (47,9)		1 ^{ref}
TC	≤ 1 partners	39 (41,1%)	9 (20)			8 (34,8)		
CC	≤ 1 partners	0 (0%)	0 (0)			0 (0)		
TT	> 1 partners	3 (3,1%)	2 (4,4)	1	1,130 (0,175 - 7,275)	1 (4,3)	1	1,181 (0,111 - 12,517)
TC	> 1 partners	14 (14,7%)	8 (17,8)	1	0,968 (0,352 - 2,660)	3 (13)	1	0,759 (0,184 - 3,128)
CC	> 1 partners	0 (0%)	3 (6,7)	0,059*¹	Undefined	0 (0)	-	-

N: number of patients.

* Chi-squared test., OR: odds ratio, 95% CI: confidence interval. $p \leq 0.05$.¹: A estatística não foi considerada devido ao OR (CI).

TABELA VI- a

<i>PARP-1 (A40676G)</i>		NIC (-)	NIC I			NIC II / III		
Alcohol	N = 29 (%)	N = 50 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	N = 25 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	
TT	NON	9 (56,3)	23 (63,9)		1 ^{ref}	9 (69,2)	1 ^{ref}	
TC	NON	7 (43,7)	11 (30,6)	0,433	0,614 (0,181 - 2,085)	4 (30,8)	0,072 0,571 (0,122 - 2,657)	
CC	NON	0 (0)	2 (5,5)	1	Undefined	0 (0)	0,026 0,000 (Undefined)	
TT	YES	3 (23,1)	6 (42,9)		1 ^{ref}	4 (33,3)	1 ^{ref}	
TC	YES	7 (53,8)	7 (50)	0,669	0,500 (0,088 - 2,841)	8 (66,7)	1 0,857 (0,140 - 5,228)	
CC	YES	3 (23,1)	1 (7,1)	0,265	0,166 (0,011 - 2,368)	0 (0)	0,200 0,000 (Undefined)	
Smoking Status	N = 29 (%)	N = 49 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	N = 25 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	
TT	Non smoker	8 (33,3)	28 (58,3)		1 ^{ref}	12 (54,5)	1 ^{ref}	
TC	Non smoker	13 (54,2)	17 (35,4)	0,066	0,373 (0,128 - 1,086)	10 (45,5)	0,279 0,512 (0,151 - 1,731)	
CC	Non smoker	3 (12,5)	3 (6,3)	0,313	0,285 (0,048 - 1,699)	0 (0)	0,093 0,000 (Undefined)	
TT	Active smoker	4 (80)	1 (100)		1 ^{ref}	1 (33,3)	1 ^{ref}	
TC	Active smoker	1 (20)	0 (0)	1	0,000 (Undefined)	2 (66,7)	0,464 8,000 (3,310 - 206,383)	
CC	Active smoker	0 (0)	0 (0)	1	0,000 (Undefined)	0 (0)	1 0,000 (Undefined)	
IVS	N = 28 (%)	N = 49 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	N = 24 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	
TT	≤ 18 years	6 (42,9)	16 (57,2)		1 ^{ref}	10 (55,6)	1 ^{ref}	
TC	≤ 18 years	7 (50)	10 (35,7)	0,361	0,535 (0,139 - 2,059)	8 (44,4)	0,605 0,685 (0,163 - 2,873)	
CC	≤ 18 years	1 (7,1)	2 (7,1)	1	0,750 (0,057 - 9,871)	0 (0)	0,411 0,000 (Undefined)	
TT	> 18 years	5 (35,7)	13 (61,9)		1 ^{ref}	2 (33,3)	1 ^{ref}	
TC	> 18 years	7 (50)	7 (33,3)	0,276	0,384 (0,088 - 1,673)	4 (66,7)	1,000 1,428 (0,184 - 11,085)	
CC	> 18 years	2 (14,3)	1 (4,8)	0,247	0,192(0,014 - 2,622)	0 (0)	1 0,000 (Undefined)	
N° of sexual partners per year	N = 29 (%)	N = 45 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	N = 23 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	
TT	≤ 1 partners	5 (25)	23 (71,9)		1 ^{ref}	11 (57,9)	1 ^{ref}	
TC	≤ 1 partners	13 (65)	9 (28,1)	0,003*	0,150 (0,041 - 0,545)	8 (42,1)	0,099 0,279 (0,070 - 1,107)	
CC	≤ 1 partners	2 (10)	0 (0)	0,048	0,000 (Undefined)	0 (0)	0,137 0,000 (Undefined)	
TT	> 1 partners	7 (77,8)	2 (15,4)		1 ^{ref}	1 (25)	1 ^{ref}	
TC	> 1 partners	1 (11,1)	8 (61,5)	0,015*	28,000 (2,067 - 379,265)	3 (75)	0,066 21,000 (0,961 - 458,867)	
CC	> 1 partners	1 (11,1)	3 (23,1)	1	1,500 (0,055 - 40,635)	0 (0)	1 0,000 (Undefined)	

N: number of patients.

* Chi-squared test., OR: odds ratio, 95% CI: confidence interval. $p \leq 0.05$.

TABELA VI- b

<i>PARP-1</i> (A40676G)		Alcohol	NIC (-) N = 29 (%)	NIC I N = 50 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	NIC II / III N = 25 (%)	<i>p</i>	OR (CI)
TT	NON		9 (31)	23 (46)		1 ^{ref}	9 (36)		1 ^{ref}
TC	NON		7 (24,2)	11 (22)			4 (16)		
CC	NON		0 (0)	2 (4)			0 (0)		
TT	YES		3 (10,3)	6 (12)	1	0,782 (0,160 - 3,821)	4 (16)	1	1,333 (0,229 - 7,743)
TC	YES		7 (24,2)	7 (14)	0,151	0,391 (0,106 - 1,436)	8 (32)	0,848	1,142 (0,289 - 4,507)
CC	YES		3 (10,3)	1 (2)	0,098	0,130 (0,011 - 1,424)	0 (0)	0,228	0,000 (Undefined)
		Smoking Status	NIC (-) N = 29 (%)	NIC I N = 49 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	NIC II / III N = 25 (%)	<i>p</i>	OR (CI)
TT	Non smoker		8 (27,6)	28 (57,1)		1 ^{ref}	12 (48)		1 ^{ref}
TC	Non smoker		13 (44,8)	17 (34,7)			10 (40)		
CC	Non smoker		3 (10,3)	3 (6,1)			0 (0)		
TT	Active smoker		4 (13,8)	1 (2)	0,020*	0,071 (0,007 - 0,732)	1 (4)	0,16	0,166 (0,015 - 1,777)
TC	Active smoker		1 (3,5)	0 (0)	0,243	0,000 (Undefined)	2 (8)	1	1,333 (0,102 - 17,278)
CC	Active smoker		0 (0)	0 (0)	-	0,000 (Undefined)	0 (0)	0,428	0,000 (Undefined)
		IVS	NIC (-) N = 28 (%)	NIC I N = 49 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	NIC II / III N = 24 (%)	<i>p</i>	OR (CI)
TT	≤ 18 years		6 (21,4)	16 (32,6)		1 ^{ref}	10 (41,7)		1 ^{ref}
TC	≤ 18 years		7 (25)	10 (20,4)			8 (33,3)		
CC	≤ 18 years		1 (3,6)	2 (4,1)			0 (0)		
TT	> 18 years		5 (17,9)	13 (26,5)	1	0,975 (0,241 - 3,931)	2 (8,3)	0,913	0,240 (0,034 - 1,648)
TC	> 18 years		7 (25)	7 (14,3)	0,166	0,375 (0,091 - 1,530)	4 (16,7)	0,251	0,342 (0,069 - 1,684)
CC	> 18 years		2 (7,1)	1 (2)	0,231	0,187 (0,014 - 2,467)	0 (0)	0,183	0,000 (Undefined)
		N° of sexual partners per year	NIC (-) N = 29 (%)	NIC I N = 45 (%)	<i>p</i>	OR (CI)	NIC II / III N = 23 (%)	<i>p</i>	OR (CI)
TT	≤ 1 partners		5 (17,2)	23 (51,1)		1 ^{ref}	11 (47,9)		1 ^{ref}
TC	≤ 1 partners		13 (44,8)	9 (20)			8 (34,8)		
CC	≤ 1 partners		2 (6,9)	0 (0)			0 (0)		
TT	> 1 partners		7 (24,1)	2 (4,4)	0,002*	0,062 (0,009 - 0,393)	1 (4,3)	0,027*	0,064 (0,006 - 0,678)
TC	> 1 partners		1 (3,5)	8 (17,8)	1	1,739 (0,175 - 17,222)	3 (13)	1	1,363 (0,112 - 16,578)
CC	> 1 partners		1 (3,5)	3 (6,7)	1	0,652 (0,055 - 7,642)	0 (0)	0,352	0,000 (Undefined)

N: number of patients.

* Chi-squared test., OR: odds ratio, 95% CI: confidence interval. $p \leq 0.05$

4. APÊNDICE III

ARTIGO

JrnllID 13277_ArtID 1988_Proof# 1 - 23/04/2014

Tumor Biol.
DOI 10.1007/s13277-014-1988-8

RESEARCH ARTICLE

Association of TP53 codon 72 and intron 3 16-bp Ins/Del polymorphisms with cervical cancer risk

Tatiana Dantas Rodrigues · Érika Hardy Lemos ·
Lia Moreira Pinto Cunha · José Eleutério Júnior ·
Rosiane Alves de Sousa Teles · Sílvia Helena Barem Rabenhorst

Received: 30 January 2014 / Accepted: 17 April 2014
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2014

Abstract Cervical cancer incidence has grown worldwide, with it being a more significant problem in developing countries. Invasive squamous cell cervical cancers are preceded by a long phase of preinvasive disease, known as cervical intraepithelial neoplasia. Cervical cancer can develop when the virus takes advantage of any *TP53* gene dysfunction of the host organism. *TP53* is responsible for encoding the tumor suppressor p53 phosphoprotein, which helps preserve genome integrity. Currently, many studies have focused on genetic polymorphisms as an important contribution to cancer susceptibility, but few related to cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Thus, the present study aimed to see whether patients with suspected CIN had *TP53* gene polymorphisms that might have contributed to the development of neoplasia. This study included 133 women who were referred to the Cervical Pathology Clinic of the Maternity School Assis Chateaubriand MEAC for suspected cervical lesions. Polymorphism genotyping was carried out by the PCR-RFLP technique using DNA extracted from patients' blood. The most frequent genotype in both CIN(+) and CIN(-) patients was Arg/Pro *TP53* codon 72 and A1A1 for 16-bp Del in intron 3. No risk of cervical cancer was found for the polymorphisms studied.

However, a significant association was found when the two polymorphisms were combined: patients with the A1A1/ArgPro genotype were statistically more frequent in the CIN(-) group ($p=0.042$), while A2A2-A1A2/ProArg was significantly more frequent in the CIN(+) group. The results of our study suggest that combined analysis of *TP53* polymorphisms Arg72Pro and 16-bp Ins/Del may help to monitor the development of CIN in Brazilian women.

Keywords HPV · Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) · Polymorphism · *TP53* gene

Introduction

Cervical cancer is the third most common carcinoma in women worldwide, and consequently, it has become a public health problem. Global estimations suggest 529,000 new cases of cervical cancer per year, with a mortality rate of 52 % and 275,000 deaths in women. In Brazil, cervical cancer is the fifth most common cancer with 18,000 new cases in 2012 [8]. Invasive squamous cell cervical cancers are preceded by a long phase of preinvasive disease, collectively referred to as cervical intraepithelial neoplasia (CIN). The human papillomavirus (HPV) is the etiologic agent of cervical cancer. The DNA of this virus is identified in almost all cervical cancer and CIN cases [15, 28–30]. The ability of HPV to mediate carcinogenesis is mainly due to the activities of the oncogenic viral proteins E6 and E7. E7 complexes with the RB protein, a cell growth regulator, and causes cell proliferation deregulation, while E6 binds to the *TP53* protein and promotes its degradation, which neutralizes the effect of *TP53* protein and leads to the loss of *TP53*-mediated control [5, 17]. The *TP53* pathway is crucial for effective prevention of the propagation of genetically damaged cells, either directly, by its participation in DNA repair mechanisms, or indirectly, by inducing

T. D. Rodrigues · É. H. Lemos · J. E. Júnior
Department of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

L. M. P. Cunha
Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

R. A. de Sousa Teles
Medical Clinic of Lower Genital Tract Pathology - MEAC,
Ann Arbor, MI, USA

S. H. B. Rabenhorst (✉)
Section of Genetics, Department of Pathology and Forensic
Medicine, Universidade Federal do Ceará, Monsenhor Furtado street,
S/N Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE 60441-750, Brazil
e-mail: srabenhorst@yahoo.com.br

68 apoptosis proteins [4]. Polymorphisms in the *TP53* gene can
 69 change its function. Nearly 100 genetic polymorphisms have
 70 been identified in the *TP53* gene (listed at <http://p53.iarc.fr>) [7,
 71 22]. The most widely studied polymorphism of this gene is the
 72 codon 72 polymorphism in exon 4 (Arg72Pro, rs1042522).
 73 Storey et al. [19] suggested that such modification predisposes
 74 to HPV cervical cancer, on the basis of the observation that the
 75 *TP53* arginine isoform was significantly more susceptible to
 76 inactivation by HPV E6 oncoprotein than the proline isoform.
 77 The most common intronic variation is the 16-bp insertion/
 78 deletion in intron 3 (rs17878362), which has been associated
 79 with reduction in *TP53* messenger RNA (mRNA) level and
 80 alternative splicing, consequently affecting the ratio of protein
 81 isoforms [7, 22]. Mitra et al. [28] found in their study that
 82 increased risk for developing cervical cancer was associated
 83 with the presence of the A2 allele.

84 Taking into account the importance of this gene, many
 85 studies have been conducted to identify associations between
 86 some of these polymorphisms and cancer development [3, 9,
 87 13]. However, despite an increase in information in this area,
 88 recent studies linking cancer incidence and *TP53* polymor-
 89 phisms are still conflicting, especially when considering the
 90 different types of cancer [4, 14, 23, 28]. In cervical
 91 cancer, the majority of these studies are related to the
 92 Arg72Pro polymorphism. There are only two studies re-
 93 lated to the 16-bp Ins/Del polymorphism, one of them
 94 combining it with the two *TP53* polymorphisms [26,
 95 28]. Accordingly, our study aimed to investigate the im-
 96 portance of *TP53* polymorphisms, independently and com-
 97 bined, in the development of cervical intraepithelial lesions
 98 comparing CIN-positive and CIN-negative patients. Studies
 99 that can contribute to this field are extremely important
 100 because they can identify patients who have a greater
 101 probability of developing more severe lesions.

102 **Materials and methods**

103 **Patients**

104 The present study was submitted to the National Council on
 105 Ethics in Research - CONEP and approved by the Ethics
 106 Committee of the Maternity School Assis Chateaubriand
 107 (MEAC) on 12 April 2011, CEP/MEAC no. 0035/11, Proto-
 108 col 17/11. This study included 133 women who were referred
 109 to the Cervical Pathology Service of Maternity School Assis
 110 Chateaubriand - MEAC, a hospital associated with the Federal
 111 University of Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará State, Brazil.
 112 These women, who were being seen for suspected cervical
 113 lesions, agreed to participate in the study. Excluded from the
 114 study were patients younger than 12 years old, treated for
 115 external or internal condylomas, or treated for cervical disease
 116 by ablation (cryotherapy or laser ablation).

117 During colposcopy, a biopsy was taken in patients who had
 118 areas with lesions, which was sent to the UFC Department of
 119 Pathology laboratory for histopathologic diagnosis. At the
 120 same time, blood samples were collected in venipuncture
 121 tubes containing EDTA for DNA extraction. The criteria for
 122 histopathologic diagnosis of CIN were those established by
 123 WHO, in which the presence of disorganized squamous epi-
 124 thelium, cellular atypia and mitoses, and the presence of
 125 abnormal cellular changes associated with HPV (koilocytes)
 126 are classified as mild dysplasia (cervical intraepithelial neo-
 127 plasia I—CIN I) or moderate and severe dysplasia (cervical
 128 intraepithelial neoplasia II—CIN II and CIN III), and CIN
 129 negative for other pathologies with no cervical neoplastic
 130 changes identified [18].

DNA extraction and detection of *TP53* polymorphisms 131

132 The extraction of genomic DNA from blood samples was
 133 done by the salting-out method. DNA was quantified using a
 134 Thermo NanoDrop Na-1000 Spectrophotometer, and the
 135 DNA quality was checked on a 1 % agarose gel. Codon 72
 136 polymorphism was determined by PCR followed by restric-
 137 tion enzyme digestion (PCR-RFLP) [2] and the 16-bp Ins/Del
 138 polymorphism by PCR [16]. The information on genotyping
 139 is described in Table 1. The amplification of gene fragments
 140 was confirmed on a 1 % agarose gel stained with ethidium
 141 bromide. The restriction digest fragments were visualized on
 142 an 8 % polyacrylamide gel with silver staining. For both
 143 polymorphisms, randomly selected samples were re-
 144 genotyped (10 % of samples).

Results 145

146 In this study, the median age of the patients was 21 years, with
 147 a range of 14 to 50 years. Among the patients with cervical
 148 lesions, 41.3 % (55/133) underwent cervical biopsy. CIN was
 149 diagnosed in 82 % (45/55) of these cases, where 68.9 % were
 150 CIN I (31/45), 24.4 % were CIN II (11/45), and 6.7 % were
 151 CIN III (3/45). The CIN(−) cases and those without lesions
 152 (patients who did not undergo cervical biopsy) were analyzed
 153 as a group to compare with CIN(+) patients. Table 2 shows the
 154 distribution of the genotype frequencies of the *TP53* Arg72Pr
 155 and 16-bp Ins/Del polymorphisms found in the present study.
 156 All patient groups were within the Hardy-Weinberg
 157 equilibrium.

158 The homozygous genotype A1A1 of *TP53* 16-bp Del was
 159 the most common genotype, considering all patients included
 160 in the study and also considering the group of CIN(−) patients.
 161 Considering the *TP53* Arg72Pro genotype frequency distribu-
 162 tions, there was a high frequency of the patients carrying the
 163 heterozygous genotype, followed by the Arg homozygous
 164 genotype. This same genotype distribution trend was observed

Tumor Biol.

Q3 t1.1 Table 1 Primer sets used and their specific annealing temperature and amplicon size

t1.2	Target region	Primer	Annealing (°C)	Restriction (°C)	Size (bp)	Author
t1.3	Arg72Pro, exon 4	F:5'GACCCAGGTCCAGATGAAGCT3' R:5'ACCGTAGCTGCCCTGGTAGGT3'	62		156 (Arg)	Bonafé et al. [2]
t1.4						
t1.5	<i>Bsr</i> UI			60	109 and 47 (Pro)	
t1.6	16-bp Ins/Del, intron 3	F:5'CTGAAAACAACGTTCTGGTA3' R:5'AGGGGGACTGTAGATGGGTG3'	60		119 (A1) 135 (A2)	Powell et al. [16]
t1.7						

165 when patients were grouped according to the presence and
166 absence of CIN. No significant differences related to the
167 genotype frequencies were found when comparing CIN(+)
168 versus CIN(-) patients (Table 2).

169 Table 3 shows the analysis of the association of both *TP53*
170 polymorphism genotypes distributed according to the histo-
171 pathology diagnosis (CIN+/CIN-). The A1A1/ArgArg was
172 the most frequent genotype in both groups. Statistically sig-
173 nificant differences were found in patients with the heterozy-
174 gous genotype of *TP53* Arg72Pro, where patients with the
175 A1A1/ProArg genotype were more frequent in CIN(-) pa-
176 tients, while A2A2-A1A2/ProArg was significantly more fre-
177 quent in CIN(+) patients. Since the number of cases for the
178 above group was small, the confidence interval in this analysis
179 was large, but the low value (protection) was near 1. When
180 20 years was used as the cutoff age, no significant differences
181 were observed between the age groups among the CIN(+)
182 patients and between CIN(+) and CIN(-) patients for the two
183 *TP53* polymorphisms, separate or combined.

184 Table 4 shows the analysis of the haplotypes of the *TP53* gene.
185 No significant association was found in the haplotype analysis.

186 **Discussion**

187 The high incidence of cervical cancer shows the need for
188 studies that identify individuals more susceptible to its

189 development. CIN is a precursor of invasive lesions, and its
190 detection is important for cancer prevention. In addition to the
191 presence of HPV infection, a prerequisite for cervical
192 intraepithelial neoplasia development, host predisposition
193 needs to be investigated [12]. From this point of view, the
194 study of polymorphisms in genes involved in the HPV carci-
195 nogenic mechanism is promising, especially the *TP53* gene
196 polymorphisms. The most studied in cancer risk is the *TP53*
197 Arg72Pro polymorphism; however, the results are inconsis-
198 tent [10, 11, 19, 25], and the intron 3 16-bp Ins/Del polymor-
199 phism is not usually considered, which could explain the
200 different findings in the literature. Accordingly, this study
201 investigated CIN susceptibility in patients with cervical le-
202 sions with regard to the two *TP53* polymorphisms, examined
203 independently or in combination.

204 In this study, no association with the risk of or protection
205 against CIN(+) was found for either *TP53* polymorphism
206 studied. Regarding the intron 3 16-bp Ins/Del polymorphism
207 of *TP53*, Fernandes et al. [26] in a study of Brazilian women
208 and Mitra et al. [28] in a study of Indian women also did not
209 find any association with cervical cancer for this polymor-
210 phism analyzed alone. Conversely, in other cancers, including
211 breast, lung, colon, and ovarian, both the A2A2 genotype and
212 A2 allele were associated with an increased risk [5, 6, 20–22].
213 More recently, a meta-analysis by Sagne et al. [22], without
214 discriminating the tumor type, found a significantly increased
215 risk for the A2A2 carriers compared with A1A1, but no risk

t2.1 **Table 2** Association of genotypes of the *TP53* polymorphisms 16-bp Ins/Del in intron 3 and Arg72Pro in intron 4, in the presence and absence of CIN

t2.2	Genotype	CIN(+) N=45 (%)	CIN(-) N=88 (%)	T	P	OR (95 % CI)	
t2.3							
t2.4	A			88		Reference	
t2.5	<i>TP53</i> 16-bp Ins/Del	A1A1	26 (57.8)	62 (70.4)			
t2.6		A1A2	17 (37.8)	24 (27.3)	41	0.181	1.68 (0.78<3.65)
t2.7		A2A2	2 (4.4)	2 (2.3)	4	0.582	2.38 (0.31<17.84)
t2.8	<i>TP53</i> Arg72Pro	A2A2/A1A2	19 (43.2)	27 (30.3)	45	0.171	1.68 (0.79<3.53)
t2.9		Arg-Arg	20 (44.4)	31 (35.2)	51		Reference
t2.10	<i>TP53</i> Arg72Pro	ArgPro	20 (44.4)	45 (51.2)	65	0.342	0.68 (0.31<1.48)
t2.11		ProPro	5 (11)	12 (13.6)	17	0.568	0.64 (0.19<2.11)
t2.12		ArgPro-ProPro	25	57	82	0.381	1.35 (0.68<2.70)

TP53 16-bp Ins/Del A1A1—reference; *TP53* Arg72Pro ArgArg—reference. Chi-square test ($p \leq 0.05$)

N number of patients CIN(+) and CIN(-), T all patients, OR odds ratio, CI confidence interval

Table 3 Association of genotypes of *TP53* Arg72Pro and 16-bp Ins/Del polymorphisms with the presence and absence of CIN

16-bp Ins/Del	Codon 72	Cervical lesion		<i>T</i>	<i>P</i>	OR (95 % CI)
		CIN(+), <i>N</i> (%)	CIN(-), <i>N</i> (%)			
A1A1	Arg/Arg	17 (85)	30 (97)	47	0.286	5.29 (0.50<54.96)
A2A2/A1A2		3 (15)	1 (3)	4		
A1A1	Arg/Pro	7 (35)	28 (62)	35	0.042*	3.06 (1.01<9.17)
A2A2/A1A2		13 (65)	17 (38)	30		
A1A1	Pro/Pro	2 (40)	4 (33)	6	1	1.33 (0.08<6.46)
A2A2/A1A2		3 (60)	8 (66.7)	11		

N number of patients CIN(+) and CIN(-), *T* all patients, *OR* odds ratio, *CI* confidence interval

* $p \leq 0.05$ (Chi-square test)

was observed for the A1A2 genotype. However, differences in genotype distribution were observed when the authors considered the geographic region. The Indian control group was statistically different from that of the Mediterranean countries, Northern Europe, or USA. In the geographic subgroup analysis, taking the homozygous A1A1 genotype as a reference, a risk was observed for the homozygous A2A2 genotype in Indian and Northern Europe populations, while A1A2 and A2A2 genotypes were associated with increased cancer susceptibility in an A2 allele dose-dependent manner for the Mediterranean population. In contrast, in the USA, no increase in cancer susceptibility was associated with carriage of the A2 allele.

Regarding the polymorphism at *TP53* codon 72, our findings are in accordance with those of Anschau et al. [1], who evaluated the frequencies of this polymorphism in Brazilian patients with premalignant and malignant cervical lesions, independently of HPV presence, and found similar frequencies of this polymorphism between controls and those with lesions. Additionally, Fernandes et al. [26], in a study of cervical cancer also in Brazilian patients, did not find any association. However, in women of Greek ethnicity, the *TP53* Arg/Arg genotype was associated with four, six, and eight times higher risk for low-grade CIN (LGCIN), high-grade CIN (HGCIN), and invasive cancer, respectively [24]. A risk associated with arginine homozygosity was also found by Mitra et al. [28] in a study of Indian women, where this genotype exhibited a 2.59-fold higher risk of developing squamous cell carcinoma of the cervix [28]. Conversely, in another study from India, Singhal et al. [32] found that the Pro/Pro genotype was associated with a 5-fold risk.

Additionally, a study by Koshiol et al. [10] in Costa Rica showed that the proline allele at codon 72 of the *TP53* gene was associated with an increased risk for the development of CIN(+) with persistent HPV infection compared to that of the control group. Controversies are also evident in meta-analysis studies. Studies published between 1998 and 2002 [11] suggested that any effect of the polymorphism at *TP53* codon 72 was probably modest, with a small increase in cervical cancer risk associated with arginine at codon 72. However, more recent meta-analysis conducted by Zhou et al. [33] showed that the Pro/Pro genotype of *TP53* codon 72 polymorphism was significantly related to cervical cancer risk among Indians, while no associations were found in populations in China, Japan, and Korea. These contradictory results could be due to differences in ethnic background and point to the importance of studies from other world regions.

To understand the influence of these polymorphisms on CIN development, an analysis of the two polymorphisms together was done. From this analysis, CIN(-) patients with the A1A1-Pro/Arg genotypes were statistically more frequent, and CIN(+) patients were significantly associated with the A2A2/A1A2-Pro/Arg genotypes, suggesting that the A1A1 genotype confers protection and that the A2 allele conversely confers risk for developing more severe lesions. The only study that examined both polymorphisms was that of Mitra et al. [28], in which haplotype analyses showed that in cervical cancer patients, the risk was associated with 16-bp Del (A1) and arginine alleles in Indian women.

However, in our study, no association was found in the haplotype analysis. In fact, the association found in the present study was with the genotype cited above. Controversial data

Table 4 Analysis of haplotype frequencies considering *TP53* 16-bp Ins/Del and *TP53* Arg72Pro

Patient group	p53 haplotypes				<i>p</i>
	A1/Arg, <i>N</i> (%)	A1/Pro, <i>N</i> (%)	A2/Arg, <i>N</i> (%)	A2/Pro, <i>N</i> (%)	
CIN(+)	40 (42.1)	23 (24.3)	16 (16.8)	16 (16.8)	0.346
CIN(-)	76 (43.7)	55 (31.6)	18 (10.3)	25 (14.4)	

Statistically significant when $p \leq 0.05$

278 are also found in breast cancer studies, where Costa et al. [4]
 279 found a statistically significant association between the Arg/
 280 A2 haplotypes and familial breast cancer, while Osorio et al.
 281 [31] found that A1-Pro was associated with BRCA1 or
 282 BRCA2 mutation risk. The aforementioned meta-analysis
 283 [22] pointed out that the risk for cancer development varies
 284 with region and the cancer involved for both *TP53* polymor-
 285 phisms, but most of the studies demonstrated an association
 286 with the presence of A2 or A2A2 16-bp Ins and Arg or Arg/
 287 Arg codon 72 genotypes [4, 14, 21, 23]. There were no
 288 previous studies comparing both polymorphisms in CIN(-)
 289 and CIN(+) up to the time of writing.

290 The association of the intron 3 16-bp Ins/Del polymor-
 291 phism with cancer risk is based on the differences in mRNA
 292 levels and processing. An in vitro study using lymphoblastoid
 293 cell lines established from breast cancer patients demonstrated
 294 that the A1A1 genotype had higher constitutive levels of *TP53*
 295 mRNA compared with A1A2 and A2A2 genotypes. Recently,
 296 Marcel et al. [27] showed that *TP53* intron 3 is involved in the
 297 splicing regulation of *TP53* intron 2, where two transcripts can
 298 be generated, the fully spliced p53 (FSp53; the canonical p53
 299 protein), and the intron-2-retaining p53 (p53I2; N-terminally
 300 truncated isoform D40p53). On the other hand, the association
 301 with *TP53* codon 72 polymorphism came from a study by
 302 Storey et al. [19], who demonstrated that E6 of the HPV 16
 303 and 18 subtypes degraded p53 of *TP53* Arg more effectively
 304 than that of *TP53* Pro in vivo.

305 Therefore, we suggest that the HPV E6 oncoprotein could
 306 have greater affinity for the A2 allele protein, increasing the
 307 risk of developing cervical lesions and progression to cancer.
 308 Since risk was only associated here with the presence of both
 309 alleles, Arg and A2, it is also possible that the presence of both
 310 variations could contribute to the inactivation of the TP53
 311 protein by E6, explaining the conflicting results in the litera-
 312 ture. In summary, the data from the present study point to the
 313 relevance of studies considering both *TP53* polymorphisms
 314 and add to the findings of other Brazilian studies.

315 Conclusion

316 This study suggests that in Brazilian patients with cervical
 317 lesions, the A1A1-ProArg genotype was associated with
 318 CIN(-) patients, while the A2A2/A1A2-ProArg *TP53* geno-
 319 types were associated with CIN(+) patients, pointing to the
 320 importance of the combined study of the two *TP53* polymor-
 321 phisms, intron 3 16-bp Ins/Del and codon 72, for risk studies.
 322 The comparison between these two pathologic conditions can
 323 help the clinician identify the Brazilian patients with cervical
 324 lesions who have a risk of developing more severe lesions.
 325 More studies are needed to elucidate the role of these *TP53*
 326 polymorphisms in cervical lesions, also taking into account
 327 geographic area and ethnic population factors.

Acknowledgments We thank the Conselho Nacional de
 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 402694/2008-2 for
 financial support. Dr. A. Leyva (USA) helped with English editing of the
 manuscript.

Conflicts of interest None.

References

1. Anschau F, Schmitt VM, Gonçalves MAG, Garicochea B. Associação entre o polimorfismo no códon 72 da p53 e as lesões pré-malignas e malignas cervicais. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005;27(10):607–12. 336
2. Bonafé M, Salvioi S, Barbi C, Mishto M, Trapassi C, Gemelli C, et al. p53 codon 72 genotype affects apoptosis by cytosine arabinoside in blood leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;299(4):539–41. 337
3. Buitrago-Perez AA, Garulet G, Vazquez-Carballo A, Paramio JM, Garcia-Escudero R. Molecular signature of HPV-induced carcinogenesis: pRb, p53 and gene expression profiling. *Curr Genomics.* vol.10, n.1. 2009. 338
4. Costa S, Pinto D, Pereira D, Rodrigues H, Cameselle-Teijeiro J, Medeiros R, et al. Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16 bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. *BMC Cancer.* 2008;8:32. 339
5. Freitas TP, Carmo BB, Paula FDF, Rodrigues LF, Fernandes AP, Fernandes PA. Molecular detection of HPV 16 and HPV 18 in cervical samples of patients from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop.* 2007;49(5):297–301. 340
6. Hu Z, Li X, Qu X, He Y, Ring BZ, Song E, et al. Intron 3 16 bp duplication polymorphism of TP53 contributes to cancer susceptibility: a meta-analysis. *Carcinogenesis.* 2010;31(4):634–47. 341
7. IARC - International Agency for Research on Cancer. www.iarc.fr. Acessado em maio/2013. 342
8. INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativas 2012 – Incidência de Câncer no Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. In: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>. Acesso em 15/10/2012. 343
9. Jiang P, Liu J, Zeng X, Li W, Tang J. Association of TP53 codon 72 polymorphism with cervical cancer risk in Chinese. *Cancer.* 2010;197(2):174–8. 344
10. Koshiol J, Hildesheim A, Gonzalez P, Bratti MC, Porras C, Schiffman M, et al. Common genetic variation in TP53 and risk of human papillomavirus persistence and progression to CIN3/cancer revisited. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(5):1631–7. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0830. 345
11. Klug SJ, et al. TP53 codon 72 polymorphism and cervical cancer: a pooled analysis of individual data from 49 studies. *Lancet Oncol.* v10. 2009. 346
12. Malcolm EK, Baber GB, Boyd JC, Stoler MH. Polymorphism at codon 72 of p53 is not associated with cervical cancer risk. *n.13 .v. 4.* p.373-8. 2000. 347
13. Mattick JS. RNA Regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet.* 2004;5:316. 348
14. Neves Filho EH, Cordeiro DEF, Vieira APF, Rabenhorst SHB. *TP53* codon 72 and intron 3 polymorphisms and mutational status in gastric cancer: an association with tumor onset and prognosis. *Pathobiology.* 2012. 349
15. Piña-Sánchez P, Hernández-Hernández DM, Taja-Chayeb L, Cerda-Flores RM, González-Herrera AL, Rodea-Avila C, et al. Polymorphism in exon 4 of TP53 gene associated to HPV 16 and HPV 18 in Mexican women with cervical cancer. *Med Oncol.* 2011;28:1507–13. 350

- 390 16. Powell BL, Van Staveren IL, Roosken P, Grieu F, Berns EM, 423
 391 Iacopetta B. Associations between common polymorphisms in 424
 392 TP53 and p21WAF1/Cip1 and phenotypic features of breast cancer. 425
 393 *Carcinogenesis*. 2002;23:311–5.
- 394 17. Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz. Human papilloma- 426
 395 virus infection: biology, epidemiology and prevention. *Int J Gynecol* 427
 396 *Cancer*. 2005;15:727–46.
- 397 18. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'connor D, Prey M. 430
 398 The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of 431
 399 cervical cytology. *JAMA*. 2002;287(16):2114–9.
- 400 19. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, 432
 401 et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human 433
 402 papillomavirus associated cancer. *Nature*. 1998;393:229–34.
- 403 20. Trifa F, Karray-Chouayekh S, Imed Mabrouk I, Baccouche S, 434
 404 Khabir A, Sellami-Boudawara T, et al. Haplotype analysis of 435
 405 p53 polymorphisms: Arg72Pro, Ins16bp and G13964C in 436
 406 Tunisian patients with familial or sporadic breast cancer. 437
 407 *Cancer Epidemiol*. 2010;34:184–8.
- 408 21. Gemignani F, Moreno V, Landi S, Moullan N, Chabrier A, Enriquez 438
 409 SG, et al. ATP53 polymorphism is associated with increased risk of 439
 410 colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene*. 440
 411 2004;23:1954–6.
- 412 22. Sagne C, Marcel V, Amadou A, Hainaut P, Olivier M, Hall J. A meta- 441
 413 analysis of cancer risk associated with the TP53 intron 3 duplication 442
 414 polymorphism (rs17878362): geographic and tumor-specific effects. 443
 415 *Cell Death Dis*. n.4.e. 492. doi: 10.1038. 2013.
- 416 23. Wu X, Zhao H, Amos CI, Shete S, Maman N, Hong WK, Kadlubar 444
 417 FF, Spitz MR. p53 genotype and haplotypes associated with lung 445
 418 cancer susceptibility and ethnicity. *J Natl Cancer Inst*. v.19. n.9. 2002. 446
 419
- 420 24. Agorastos T, Lambropoulos AF, Constantinidis TC, Kotsis A, Bontis 447
 421 JN. p53 codon 72 polymorphism and risk of intra-epithelial and 448
 422 invasive cervical neoplasia in Greek women. *Eur J Cancer Prev*. 449
 423 p.113–8. 2000.
- 424 25. Tornesello ML, Buonaguro L, Buonaguro FM. Mutations of the 450
 425 TP53 gene in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the 451
 426 cervix: a systematic review. *Gynecol Oncol*. 2012.
- 427 26. Fernandes TA, Lima GL, DE Sousa FC, Fernandes JV, Meissner RV. 452
 428 Evaluation of the polymorphisms in the exons 2 to 4 of the TP53 in 453
 429 cervical carcinoma patients from a Brazilian population. *Cell Mol* 454
 430 *Biol*. 2008.
- 431 27. Marcel V, Tran PLT, Sagne C, Martel-Planche G, Vaslin L, Meulade- 455
 432 Fichou MP, Hall J, Mergny JL, Hainaut P, Dyck EV. G-quadruplex 456
 433 structures in TP53 intron 3: role in alternative splicing and in pro- 457
 434 duction of p53 mRNA isoforms. *Oxford Journal*. 2010.
- 435 28. Mitra S, Misra C, Singh RK, Panda CK, Roychoudhury S. 458
 436 Association of specific genotype and haplotype of p53 gene with 459
 437 cervical cancer in India. *J Clin Pathol*. 2005.
- 438 29. Chan PKS, Li WH, Chan MYM, Ma WL, Cheung JLK, Cheng AF. 460
 439 High prevalence of human papillomavirus type 58 in Chinese women 461
 440 with cervical cancer and precancerous lesions. *J Med Virol*. 1999. 462
 441
- 442 30. Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological 463
 443 evidence. *J Clin Virol*. 2000.
- 444 31. Osorio A, Martinez-Delgado B, Pollan M, Cuadros M, Urioste M, 464
 445 Tor-Renteras C, Melchor L, Diez O, DE La HM, Velasco E, 465
 446 Gonzalez-Sarmiento R, Caldes T, Alonso C, Benitez J. A haplotype 466
 447 containing the p53 polymorphisms Ins16bp and Arg72Pro modifies 467
 448 cancer risk in BRCA2 mutation carriers. *Hum Mutat*. 2006.
- 449 32. Singhal P, Hussain S, Thakur N, Batra S, Salhan S, Bhambani S, 468
 450 Bharadwaj M. Association of MDM2 and p53 polymorphisms with 469
 451 the advancement of cervical carcinoma. *DNA and Cell Biology*. V. 470
 452 32, Nº. 1, *Mary Ann Liebert, Inc. Pp. 19–27. DOI: 10.1089/dna. 471
 453 2012.1718. 2013.
- 454 33. Zhou, X, Gu Y, Zhang SL. Association between p53 codon 72 472
 455 polymorphism and cervical cancer risk among Asians: a Huge 473
 456 Review and Meta-analysis. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 13 (10), 474
 457 4909–4914. DOI:10.7314/APJCP.2012.13. 10.4909. 2012. 475

APÊNDICE IV - QUESTIONÁRIO



Ficha de cadastramento



Nome: _____ Idade: ____ anos
 Prontuário: _____ Telefone: _____ Profissão: _____
 Endereço: _____ Procedência: _____

Cor: () Branca () Misturada () Negra () Amarela
 Estado Civil: () solteira () casada () divorciada
 Primeira consulta? () sim () não Ano: _____

Idade Menarca: ____ anos Uso de contraceptivos
 atualmente: () sim () não Tempo: _____
 Já usou contraceptivos: () sim () não Tempo: _____
 Tipo de contraceptivo () usou () usa: () Condon
 () Oral () Injeção Intramuscular () Outros _____
 Início da Vida Sexual (I.V.S.): ____ anos () Virgem
 Data da Última Menstruação (D.U.M.): ____/____/____
 () Não sabe
 Gestação/ Parto/ Aborto: ____/____/____
 Idade na primeira gestação: ____ anos
 Grávida: () sim () não Tempo de Gestação: _____
 Aborto: () Espontâneo Quantidade: _____
 () Não espontâneo Quantidade: _____

Tabagismo: () sim () não Cigarros/Dia: _____
 Fumante passiva: () sim () não Álcool: () sim () não
 Frequência: () Diariamente () Semanalmente
 () Mensalmente () Raramente
 Parceiro fixo: () sim Quanto tempo _____
 () não
 Número de parceiros no último ano: _____
 Histórico de CA na família: () sim () não () não sabe
 Grau de parentes co: _____
 Tipo de Câncer: _____

História Prévia Clínica:
 Citologia Prévia: [Data: ____/____/____];
 Resultado: _____
 Antecedentes DST:

 Se há lesões, início do aparecimento: _____
 Se há lesões, tipo: _____

Quadro Clínico Atual
 Queixa principal (QP):

 Se há lesões, início do aparecimento: _____
 Se há lesões, tipo: _____

Vulvoscopia: () Normal () Anormal
 Achados Anormais: _____
 Aspecto, localização e número de lesões:

 Ácido acético 5%: () Positivo () Negativo
 Teste de Collins (Azul de Toluidina 2%):
 () Positivo () Negativo

Colposcopia: () Anormal
 Vagina: _____ Colo: Junção
 Escamocolumnar (JEC): _____
 Zona de Transformação Tipo: () 1 () 2 () 3
 Epitélios: Acetobranco: () plano () espessado
 Mosaicico: () Fino () Grosseiro
 Pontilhado: () Fino () Grosseiro
 Iodo: () Parcialmente Positivo () Negativo Vasos
 atípicos () Outros achados: _____
 Teste de Schiller: () Positivo () Negativo
 Sítios: _____
 Extirpação total da lesão: () sim () não

Colposcopia: () Normal () Com limitação*
 *Justificativa: _____
 Vagina: _____ Colo: () Padrão
 () Ectopia Cilíndrica () JEC: _____
 Zona de Transformação Tipo: () 1 () 2 () 3
 Colo: () Padrão () Ectopia Cilíndrica () JEC:
 _____ () Pólipo Quantidade: _____
 () Outros

Observações:

Responsável pela coleta:

Médico: _____
Data: ____/____/____

APÊNDICE V

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada para participar de uma pesquisa denominada **FREQUENCIA DA INFECÇÃO PELO HPV EM PACIENTES, COM LESÕES CERVICAIS, DO CEARÁ: ASSOCIAÇÃO COM ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS, HISTOPATOLÓGICAS E MARCADORES MOLECULARES**, que tem como objetivo principal caracterizar o perfil sexual das pacientes atendidas no ambulatório especializado da rede pública e estimar a frequência de infecção do Papiloma vírus Humano (HPV) nessas pacientes.

O propósito deste folheto é esclarecer aberta e claramente todos os procedimentos envolvidos no estudo clínico, antes de sua decisão quanto à participação. O estudo está sendo realizado pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. Cerca de 300 pacientes, mulheres serão incluídas no presente estudo. Portanto, se concordar em participar você será uma delas, que não terá benefício direto imediato, em princípio, mas que estará contribuindo para que se entenda melhor o perfil sexual social e patológico de mulheres cearenses e assim poder beneficiar um número maior de pessoas no futuro.

Nenhuma mudança será feita no seu tratamento, no que diz respeito ao número de aplicações ou nos medicamentos que seriam utilizados. Os efeitos colaterais, porventura existentes serão os do tratamento a que você já iria se submeter e que serão explicados pelo médico assistente. Nenhum efeito colateral poderá ser atribuído ao presente trabalho. A única coisa que será feita de diferente será a coleta de uma amostra de sangue, em torno de 5mL (uma colher de sobremesa), além da coleta de esfregaço endocervical, para se examinar a presença de HPV (e, em caso positivo, a identificação do seu subtipo para análise de risco). Esta coleta será realizada no ambulatório, sob supervisão do seu médico, o que não determinará nenhum risco adicional.

Paralelamente serão anotados alguns dados referentes a você no que diz respeito ao Perfil Social (Estado Civil, idade do nascimento, entre outros), Perfil Sexual (data da última menstruação, uso de contraceptivos, entre outros), História

Prévia Clínica (História de câncer na família, entre outros), Quadro Clínico Atual (Queixa Principal) e informações relativas aos testes de Vulvosopia e Colposcopia previamente realizados. Estas informações serão perguntadas a você ou poderão ser retiradas do seu prontuário.

É importante entender que você não é obrigada a participar do estudo. Se você decidir não participar ou desejar suspender a participação em qualquer momento, você não precisa dar explicações e continuará sendo assistida e tratada com o melhor cuidado possível, devendo comunicar esta decisão a seu médico, para que ele tome conhecimento e faça os esclarecimentos devidos. Se a qualquer momento seu médico achar melhor realizar uma mudança no tratamento, ele fará a mudança que se fizer necessária sem nenhum prejuízo para a pesquisa.

Fique à vontade para formular pergunta aos pesquisadores, cujos nomes e telefones serão encontrados ao final deste folheto, mesmo que pareça muito simples sua dúvida. Você poderá também conversar sobre o estudo com familiares, amigos ou com o médico que lhe assiste.

Todos os seus dados pessoais serão tratados de maneira estritamente confidencial, ficando sua identificação inteiramente protegida.

A qualquer época você poderá ter acesso às informações e conclusões do presente estudo, bem como os resultados de seus exames individualmente.

Se porventura, surgir alguma informação que possa vir a lhe beneficiar, você será imediatamente comunicada.

Se você tiver alguma dúvida posteriormente, você poderá contatar os pesquisadores descritos abaixo a qualquer momento, bem como se você tiver alguma preocupação com o seu tratamento, a extensão de sua doença ou qualquer outro problema.

Deve ficar bem claro que a qualquer tempo você poderá pedir para sair do estudo se não for mais conveniente para você, devendo comunicar esta decisão a seu médico, para que ele tome conhecimento e faça os esclarecimentos devidos, ficando claro que isso não resultará, em nenhuma hipótese, prejuízo para o seu atendimento atual ou no futuro nesta instituição.

NOME: **Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst** TELEFONE: (85) 9994-5689

NOME: **Dr. José Eleutério Júnior** TELEFONE: (85) 9986-8350

NOME: **Érika Hardy Lemos** TELEFONE: (85) 99930446

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA MATERNIDADE ESCOLA ASSIS
CHATEAUBRIAN – CEP/MEAC/UFC TELEFONE: (85) 3366-8500

Se você decidir participar então leia e assine o formulário na presença de seu médico e mantenha uma cópia do formulário e desse folheto para sua informação.

Você terá mais tempo para pensar se ainda estiver insegura quanto à participação.

Obrigado por ter lido esse folheto e por considerar sua participação no presente estudo.

TÍTULO DO ESTUDO: Frequência da infecção pelo HPV em pacientes, com lesões cervicais, do ceará: associação com alterações citológicas, histopatológicas e marcadores moleculares.

Nome do médico: _____

1. Confirmando que li e entendi o folheto informativo sobre o estudo acima e tive a oportunidade de questionar e tirar as dúvidas que me surgiram.
2. Entendo que minha participação é voluntária e que tenho a liberdade de desistir a qualquer tempo sem apresentar razões e sem que minha assistência médica ou direitos legais sejam afetados.
3. Entendo que os itens de quaisquer dos meus registros médicos podem ser examinados pelos representantes responsáveis pela pesquisa ou pelas autoridades regulatórias, quanto à relevância de minha participação nesse estudo de pesquisa. Concedo permissão para que esses indivíduos tenham acesso aos meus registros.
4. Concordo em participar do estudo acima.
5. É de meu conhecimento que receberei uma cópia do presente formulário de consentimento _____, ____/____/____.

Nome completo do Paciente: _____

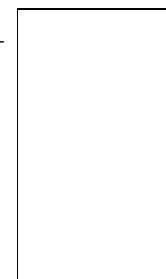
Endereço: _____

Telefone: _____

Assinatura do Paciente/Representante Legal: _____

Nome do investigador: _____

Assinatura do investigador: _____



5. ANEXO I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
MATERNIDADE-ESCOLA ASSIS CHATEAUBRIAND
Rua Coronel Nunes de Melo, S/Nº - Rodolfo Teófilo - C.G.C. 07.206.048/0001-08
PABX: (085) 4009-8523 - Fax: (085) 4009-8515
CEP 60430-270 - Fortaleza - Ceará - Brasil

OFÍCIO CEP/MEAC Nº 0035/11

Fortaleza, 12 de abril de 2011.

Protocolo nº 17/11

Pesquisadora responsável: Silvia Helena Barem Rabenhorst

Deptº/Serviço: Patologia e Medicina Legal/UFC

Título do Projeto: Frequência da Infecção pelo HPV em Pacientes com Lesões Cervicais do Ceará: Associação com Alterações Citológicas, Histopatológicas e Marcadores Moleculares

Levamos ao conhecimento de V. S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade-Escola Assis Chateaubriand da Universidade Federal do Ceará – CEP/MEAC/UFC, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional da Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196/96 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o projeto supracitado, na reunião de 29 de março de 2011.

A Pesquisadora deverá comparecer ao setor competente da Instituição, onde será realizada a pesquisa, para a confecção dos crachás, munida deste documento.

Igualmente, informamos que a mesma deverá se comprometer a comunicar qualquer ocorrência no desenvolvimento do trabalho, assim como, enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

Tereza Cristina Alves ferreira
Coordenador do CEP-MEAC/UFC

Ilma. Sra. Silvia Helena Barem Rabenhorst

E-mail: srabenhorst@hotmail.com