

LUCIA TERESA HINOJOSA SCHÄFFER

**A CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE p53 NO CARCINOMA INVASOR
DE COLO UTERINO COM FATORES CLÍNICOS E PROGNÓSTICO**

BOTUCATU - SP
2009

LUCIA TERESA HINOJOSA SCHÄFFER

**A CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE p53 NO CARCINOMA INVASOR
DE COLO UTERINO COM FATORES CLÍNICOS E PROGNÓSTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia - área de Ginecologia, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Professor Paulo Traiman.

BOTUCATU – SP
2009

Schäffer, Lucia Teresa Hinojosa

A correlação da expressão do gene p53 no carcinoma invasor de colo uterino com fatores clínicos e prognóstico. / Lucia Teresa Hinojosa Schäffer. - 2009

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2009.

Orientador: Paulo Traiman.

Assunto CAPES:

1. Colo uterino - Câncer

CDD

Palavras-chave: p53. Gene Supressor de Tumor. Câncer Cervical.

Aos meus filhos, Diogo, Maysa e Átila por existirem e me motivarem a não desistir dos meus projetos e das minhas conquistas.

Ao meu pai Humberto e minha mãe Teresa (*in memoriam*) exemplo de fé, determinação e otimismo diante da vida e minhas irmãs e irmãos pelo encorajamento e credibilidade.

AGRADECIMENTO

Agradeço e louvo ao meu Deus e Pai, Autor e Consumador da minha fé por me fazer perseverar até aqui.

Ao Prof. Helio Nunes pela orientação e colaboração nos estudos estatísticos e por em esclarecer todas as dúvidas com competência e atenção.

À Prof^a Eliane S. Abreu pela análise do estudo imunohistoquímico realizado no Departamento de Patologia da FMB, UNESP.

Aos docentes e funcionários da Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia que de alguma forma colaboraram para este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, instituição de ensino que me abraçou como profissional e docente do curso de medicina, a oportunidade de lecionar em um curso pioneiro na nossa região, desafio contínuo para todos os docentes e funcionários envolvidos, aos colegas do Departamento de Ciências Naturais que colaboraram de certa forma para que concluísse este trabalho.

Às professoras Claudia Leal Macêdo e Maria Domingues pela atenção e cuidado na seleção das imagens deste trabalho.

À prof^a Sandra, amiga e irmã pelo apoio e colaboração.

Ao Prof. Paulo Traiman,

Experiente professor e pesquisador conceituado por suas grandes publicações por ter me concedido a oportunidade de ser sua orientanda.

Obrigada pelo seu apoio e esclarecimentos prestados com muita eficiência diante das dúvidas e incertezas, pelo exemplo de simplicidade e praticidade durante a execução deste estudo.

“E é por intermédio de Cristo que temos tal confiança em DEUS; não que por nós mesmos, sejamos capazes de pensar alguma coisa, como se partisse de nós; pelo contrário, a nossa suficiência vem de DEUS” 2Co 3:4,5.

ÍNDICE

LISTAS DE TABELAS
LISTAS DE FIGURAS
LISTAS DE GRÁFICOS
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS
RESUMO
ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Proteína p53.....	18
1.2 Neoplasia de colo uterino e fatores clínicos e prognóstico.....	27
2 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	33
3.1 Casuística.....	33
3.1.1 <i>Dados clínicos</i>	33
3.1.2 <i>Seguimento clínico</i>	34
3.1.3 <i>Dados anátomo-patológicos</i>	34
3.2 Material e métodos.....	35
3.2.1 <i>Expressão da oncoproteína p53</i>	35
3.2.1.1 <i>Detecção imunohistoquímica da p53</i>	35
3.2.1.2 <i>Interpretação das reações de imunohistoquímica</i>	39
3.3 Análise estatística	40
4 RESULTADOS	41
4.1 Idade	41
4.2 Etnia	41
4.3 Paridade.....	42
4.4 Coitarca	42
4.5 Tabagismo.....	43
4.6 Anticoncepcional oral	43
4.7 Citologia	43
4.8 Histologia.....	44
4.9 Estadiamento	44
4.10 Tratamento	45
4.11 Seguimento	46
4.12 Expressão do p53	46
4.13 Graduação do p53.....	47
4.14 Associação entre p53 e idade	48
4.15 Associação entre a graduação do p53 e idade	49
4.16 Associação entre p53 e cor	50
4.17 Associação da graduação de p53 e cor	51
4.18 Associação do p53 e tabagismo.....	52

4.19 Associação da graduação do p53 e tabagismo.....	53
4.20 Associação entre a expressão do p53 e paridade.....	53
4.21 Associação entre graduação do p53 e paridade	54
4.22 Associação entre a expressão p53 e idade da coitarca	55
4.23 Associação entre a graduação do p53 e idade da coitarca	56
4.24 Associação entre a expressão do p53 e seguimento	57
4.25 Associação do p53 e uso de anticoncepcional oral.....	58
4.26 Associação entre p53 e estadio	59
4.27 Associação entre p53 e histologia.....	60
5 ANÁLISE DOS RESULTADOS	62
5.1 Associação p53 e idade	62
5.2 Associação p53 e etnia	62
5.3 Associação p53 e tabagismo.....	62
5.4 Associação p53 e paridade	63
5.5 Associação entre p53 e idade da coitarca.....	63
5.6 Associação p53 e seguimento.....	63
5.7 Associação p53 e uso de anticoncepcional oral.....	63
5.8 Associação p53 e estadio.....	64
5.9 Associação p53 e a diferenciação histológica.....	64
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS.....	71
ANEXOS	74

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo idade.....	41
Tabela 2 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo a cor.....	41
Tabela 3 - Distribuições de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo a paridade.....	42
Tabela 4 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo a idade a coitarca.....	42
Tabela 5 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo o uso do tabaco.	43
Tabela 6 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo o uso de ACO.	43
Tabela 7 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo a citologia cérvico-vaginal, segundo a classificação de Papanicolau.....	44
Tabela 8 - Distribuição de freqüências das pacientes segundo o grau de diferenciação do tumor.	44
Tabela 9 - Distribuição de freqüências das pacientes segundo o estadio.....	45
Tabela 10 - Distribuição de freqüências das pacientes segundo o tratamento.	45
Tabela 11 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo o seguimento.	46
Tabela 12 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo o p53.....	46
Tabela 13 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas segundo a graduação do p53.....	47
Tabela 14 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo p53 e idade.	48
Tabela 15 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo a graduação do p53 e a idade	49
Tabela 16 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo p53 e cor.....	50
Tabela 17 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo graduação da p53 e cor.....	51
Tabela 18 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo graduação da p53 e o uso de tabaco.....	52
Tabela 19 – Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo a graduação da p53 e tabagismo.....	53
Tabela 20 - Distribuições de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo p53 e paridade.....	54
Tabela 21- Distribuições de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo a graduação da p53 e paridade.....	55
Tabela 22 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo a p53 e a idade da coitarca.....	56
Tabela 23 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes	

segundo a graduação da p53 e a idade da coitarca.....	57
Tabela 24 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo p53 e seguimento	58
Tabela 25 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo p53 e o uso de anticoncepcional oral.....	59
Tabela 26 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo p53 e o estadio.	60
Tabela 27 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo p53 e a diferenciação histológica.....	61

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Carcinoma de célula escamosa a) pouco diferenciado; b) muito diferenciado.	34
Figura 2 - Representação esquemática do princípio da imunohistoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase. Observa-se o efeito amplificador da avidina (A) que se liga à biotina (B) do anticorpo secundário e a outras três moléculas de biotina. A peroxidase (P) reage com a 3-3' – diaminobenzidina (DAB) corando os sítios antigênicos.(1ª).....	36
Figura 3 - Fluxograma do protocolo básico de imunohistoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase (ABC) para detecção da expressão da proteína p53. (1ª).....	38
Figura 4 - Demonstração de p53 em lâmina.	39

LISTAS DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição quanto à distribuição de freqüências do p53.....	47
Gráfico 2 - Distribuição quanto à distribuição de graduação do p53.	48
Gráfico 3 - Distribuição quanto à relação do p53 e a idade.....	49
Gráfica 4 - Distribuição quanto à relação da graduação do p53 e idade.....	50
Gráfico 5 - Distribuição quanto à relação do p53 e cor.	51
Gráfico 6 - Distribuição quanto à relação graduação da p53 e etnia.....	52
Gráfico 7 - Distribuição quanto à relação graduação da p53 e tabagismo.	53
Gráfico 8 - Distribuição quanto à relação do p53 e paridade.....	54
Gráfico 9 - Distribuição quanto à relação graduação p53 e paridade.....	55
Gráfico 10 - Distribuição quanto à relação do p53 e a Idade da coitarca.	56
Gráfico 11 - Distribuição quanto à relação graduação do p53 e idade da coitarca.....	57
Gráfico 12 - Distribuição quanto à relação do p53 e seguimento.....	58
Gráfico 13 - Distribuição quanto à associação do p53 e o uso do anticoncepcional oral.....	59
Gráfico 14 - Distribuição quanto à relação do p53 e estadio.....	60
Gráfico 15 - Distribuição quanto à associação do p53 e grau histológico.	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC	Avidina-biotina-peroxidase
ACO	Anticoncepcional oral
Arg	Arginina
ASCUS	Alterações de células escamosas de significado indeterminado
CDKs	Quinases dependentes de ciclina
cm	Centímetro
DAB	Tetrahydrocloro de diaminabenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
GADD-45	Growth Arrest DNA Damage
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPV	Papiloma Vírus Humano
HTA	Histerectomia Abdominal Total
IH	Imunohistoquímica
mdm-2	Mouse double minute 2
ml	Milímetro
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico ou potencial hidrogênio iônico
Pro	Prolina
Qt	Quimioterapia
RNA	Ácido ribonucléico
Rt	Radioterapia
SIL	Lesão intra-epitelial escamosa
SOB	Salpingo-ooforectomia bilateral
SSCP	Polimorfismo conformacional
SST	Solução salina tamponada
UNESP	Universidade Estadual Paulista
WM	Werteim-Meigs

RESUMO

Durante décadas o estudo dos genes supressores de tumor têm alcançado relevância quanto a sua participação nos tumores de modo geral. A etiopatogenia do câncer cervical destaca o papel do p53, gene supressor de tumor, no desenvolvimento da doença. Considerados sítios vulneráveis de lesões críticas do DNA por funcionarem como barreiras fisiológicas contra a expansão clonal ou mutabilidade genômica, são capazes de suspender o crescimento desordenado. Considerado “guardião do genoma”, o p53, previne o acúmulo de erros em células lesadas nos seus DNAs, levando essas células a apoptose. Este gene pode apresentar-se inativado ou mutado fazendo com que, a proteína p53 tenha sua meia vida aumentada acumulando-se nas células tumorais. No presente estudo foram avaliadas retrospectivamente, 120 pacientes com carcinoma epidermóide invasivo de colo uterino, diagnosticadas, tratadas e acompanhadas no serviço de Oncologia ginecológica do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu. Através do levantamento dos prontuários, foram estudados fatores clínicos relacionados como: idade, raça, paridade, coitarca, tabagismo, uso de anticoncepcionais orais, classificação de *Papanicolau*, estadio e expressão da proteína p53. A expressão da p53 foi realizada através da técnica de imunohistoquímica em lâminas arquivadas das pacientes com câncer invasor de colo uterino, a qual mostrou-se positiva. Foram também avaliados os fatores clínicos correlacionados e prognóstico, analisadas as freqüências de algumas variáveis e realizados teste de Fisher para verificar associações entre p53 e as variáveis. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados cujos valores de p foram inferiores a 0,05. A análise dos dados encontrados quanto à expressão positiva do p53 nas pacientes com câncer epidermóide em relação a idade, nos mostrou que 89% das pacientes, com idade menor ou igual a 69 anos apresentou positividade na expressão do p53. No grupo de pacientes com idade acima de 70 anos, 5% a apresentaram positiva. A expressão do p53 foi positiva em 71,7% das mulheres brancas. Na análise de mulheres tabagistas e a expressão do p53, observou-se que esta expressão foi positiva em 36,7% das mulheres tabagistas e 52,5% não tabagistas, demonstrando não haver associação estatística significativa entre p53 e o uso do tabaco. Foi observado também não haver e associação significativa entre a expressão positiva do p53 e paridade, a idade da coitarca e o uso de anticoncepcional oral. A superexpressão da proteína p53 em câncer de colo uterino neste estudo foi encontrada numa freqüência de 15 a 50%. Concluímos que a inativação da p53 está associada com o crescimento descontrolado das células e desenvolvimento do câncer. A expressão positiva do p53 está associada com o mau prognóstico das pacientes com câncer invasivo de colo do útero e os aspectos epidemiológicos, o estadiamento, e as formas de tratamento não se evidenciaram como fatores prognósticos quando relacionados com a expressão do p53.

Palavras-chave: p53. Gene Supressor de Tumor. Câncer Cervical.

ABSTRACT

For decades the study of tumor suppressor genes has gained relevance because of its participation in tumors in general. The cervix cancer etiopathogeny highlights the role of the tumor suppressor gene p53 in the disease development. It is the vulnerable site of a DNA damage once it works as a physiological barrier inhibiting clonal expansion or genomic mutation, thus being capable of stopping irregular growth. The p53 gene is also considered the “guardian of the genome” for it prevents the accumulation of mistakes in the cells with DNA damage, putting them into apoptosis. The half-life of the p53 protein increases in the tumor cells given its inactive or mutated appearance. This study retrospectively analyzed 120 patients with invasive colon epidermoid carcinoma who were diagnosed, treated, and observed at the Gynecologic Oncology Service, HC, Medical School of Botucatu, Brazil. Reading the patients’ data, it was analyzed related clinical factors such as age, race, parity, first sex intercourse, smoking habit, use of oral contraceptive, papanicolau status, staging, and expression of p53. The p53 expression was found through the immunohistochemistry in invasive colon cancer patients’ slides, which happened to be positive. Prognostic and correlated clinical factors were also studied, as well as the frequency of some variants. The Fisher’s test was used to test associations between p53 and variants. The results were considered statistically significant, with p values under 0.05. Regarding the positive expression of p53, the data analysis has shown that 89% of the patients with epidermoid cancer and who were 69 or less had positive p53 expression. This percentage fell to 5% on patients over 70 years old. The p53 expression was positive in 71.7% of caucasians. Regarding smoking habit, 36.7% of smoker and 52.5% of non-smokers presented positive p53 expression. It showed no relation whatsoever between p53 and smoking habit. It was also observed no important statistical association between positive p53 expression and parity, first sexual contact, and the use of oral contraceptive. In this study, the superexpression of p53 in colon cancer was found in a frequency ranging from 15 to 50%. We’ve concluded that p53 inactivity is associated with cell irregular growth and cancer development. The positive expression of p53 is associated with bad prognostic on invasive colon cancer patients and the epidemiologic aspects, staging, and forms of treatment were not considered as prognostic factors when related to p53 expression.

Keywords: p53. Tumor Suppressor Gene. Cervical Cancer.

1 INTRODUÇÃO

O câncer cervical é a segunda neoplasia maligna mais comum na mulher, a cada ano registra-se cerca de 500.000 casos novos no mundo.

Esta neoplasia é responsável por cerca de 230.000 óbitos ao ano e para cada caso novo de neoplasia cervical invasiva encontrada pelo rastreamento citológico, aproximadamente 50 casos decorreram de esfregaços anormais como a lesão intraepitelial escamosa (SIL) de baixo grau e alto grau, também denominadas neoplasia intraepitelial cervical (NIC).

Nas últimas três décadas a incidência do câncer de colo uterino tem aumentado nas mulheres da raça negra e outras raças não brancas de acordo com as pesquisas, porém a incidência e mortalidade por neoplasia de colo uterino têm diminuído devido aos programas de rastreamento citológico.⁽¹¹⁾

Menos de 49% das mulheres afetadas por esta doença em países em desenvolvimento têm uma sobrevida maior que 5 anos, enquanto que em países desenvolvidos a sobrevida encontra-se em torno de 59 a 69% com média estimada em 49%.

Afeta mulheres multíparas e na perimenopausa, porém sua incidência é evidente na faixa etária de 20 a 29 anos com pico entre 45 e 49 anos.⁽¹⁸⁾

A neoplasia cervical bem como as lesões precursoras é proveniente de dois tipos de epitélio: escamoso e glandular, sendo mais freqüente no epitélio escamoso. Dentre os fatores de risco para neoplasia de colo uterino destacamos o número de parceiros sexuais, a idade da coitarca e doenças sexualmente transmissíveis como infecções virais pelo Papiloma Vírus Humano (HPV).⁽¹¹⁾

Nas duas últimas décadas o HPV, vírus de transmissão sexual, tem sido apontado como agente causal das neoplasias de colo uterino.

Através de técnicas de hibridização molecular estudos detectaram a presença do HPV na cérvix uterina.⁽²⁷⁾

O desenvolvimento do câncer em humanos envolve uma complexa sucessão de eventos regulada por padrões genéticos pré-estabelecidos.⁽³⁵⁾

As alterações genéticas presentes nas células malignas não são herdadas por meio dos gametas, estas são decorrentes de mudanças no ácido desoxirribonucléico (DNA) das células somáticas.

Em decorrência destas alterações, funções celulares que normalmente estariam sob controle são exercidas desordenadamente, resultando na expressão exagerada de proteínas responsáveis pela proliferação celular, como a p53 cuja função é controlar o ciclo celular.

A etiologia e patogênese do câncer cervical têm enfatizado nas últimas décadas o papel do p53, gene supressor de tumor, no desenvolvimento da doença.⁽⁵⁾ Este gene pode apresentar-se inativado ou mutado.

Os métodos utilizados para detectar mutações do p53 são a imunohistoquímica (IH), o polimorfismo arranjado em filamento único, e métodos de reação em cadeia pela polimerase (PCR). Cada método apresenta suas limitações em termos de especificidade.⁽²³⁾

O p53 tem um papel de “guardião do genoma” em resposta a mutagenes endógenos e exógenos.^(8, 16) O p53 encontra-se mutado em vários tipos de tumores, o tipo selvagem do p53 é mais frequentemente encontrado nos tumores iniciais de colo uterino.⁽²⁶⁾

Do ponto de vista clínico, a imunohistoquímica do p53 parece ser o método mais prático e útil de detecção de alterações do p53 em lesões pré-cancerosas e carcinomas. Esta técnica permite precisar a localização e identificação de células que inibem alterações do p53, contudo ela não pode detectar a perda completa da p53 ou mutações pequenas.⁽⁷⁾

1.1 Proteína p53

Pesquisas na etiopatogenia do câncer têm relatado a idéia de que a perda de controle do crescimento celular tem importante papel no desenvolvimento desta doença. Um dos responsáveis pelo controle do crescimento celular é o gene p53 conhecido como um gene supressor do tumor.⁽¹⁾

O p53 foi descoberto em 1979 como uma proteína ligada a um oncogene viral, o sv40, e a seqüência deste gene foi relatada por Cans e Crawford.^(1, 21, 42) Ela foi encontrada como uma fosfoproteína nuclear que pesava 53 KD que contém 393 aminoácidos, e assim nomeada p53.⁽¹⁾

O gene p53 está localizado no braço curto do cromossomo 17^(1, 4) e está presente em todas as espécies de vertebrados.⁽¹⁾

Uma das mais importantes propriedades bioquímicas deste oncogene é a sua capacidade de se ligar a seqüências específicas do DNA.^(1, 4, 20)

Inibindo a replicação do DNA, atua como um fator de transcrição que controla de forma positiva e negativa a expressão de diversos genes envolvidos em várias vias celulares, regulando a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular e da fase G para fase M. O objetivo de parada do ciclo celular em G1 é proporcionar à

célula um tempo de janela para reparar a lesão do DNA antes de entrar na fase S.⁽²⁰⁾ Desta forma é garantida a manutenção da integridade do genoma e controle da proliferação celular, além de estar envolvido na determinação da morte celular por apoptose.⁽⁷⁾

O p53 está envolvido em vários processos celulares como transcrição do gene, reparo do DNA, ciclo celular, estabilidade genômica, segregação cromossômica, senescência e apoptose (morte celular programada).^(15, 16, 20)

Os genes supressores do tumor são sítios vulneráveis de lesões críticas do DNA porque normalmente eles funcionam como barreiras fisiológicas contra a expansão clonal ou mutabilidade genômica e são capazes de suspender o crescimento desordenado.⁽¹⁵⁾

Os genes que são inativados por perda alelica, distinguem-se pela alta freqüência de mutações, a maioria destas mutações é do tipo *missense* (*troca de um nucleotídeo*) e altera a função normal da p53. Assim, a proteína p53 tem sua meia vida aumentada acumulando-se nas células tumorais.

Outro tipo de mutação pode ser do tipo *nonsense decorrente de deleções* parciais do gene ou inserção de nucleotídeos. Este tipo de mutação pode levar a um *stop códon* (parada da leitura do RNA mensageiro), alterando a proteína.⁽²⁰⁾

O p53 é uma proteína que produz um fator de transcrição nuclear que regula a atividade de vários genes, incluindo o p21, o qual está diretamente envolvido no controle do ciclo celular. A mutação do p53 é incapaz de ativar o gene p21, levando à liberação do bloqueio do ciclo celular normal promovendo assim um crescimento celular desordenado.^(7, 32)

Os genes supressores de tumor são genes que codificam proteínas capazes

de regular o crescimento celular. Quando mutados, apresentam como característica a perda da função decorrente da deleção de um dos alelos, denominado perda de heterozigose.⁽¹⁹⁾

Quando uma célula sofre lesão do DNA, o p53 tem um papel crucial, prevenindo que tais células se multipliquem, induzindo à apoptose. Porém, quando este gene sofre mutação e não pode promovê-la, tais células lesadas são capazes de continuar proliferando desordenadamente, resultando câncer.^(21, 32)

Como “guardião do genoma”, o p53, previne o acúmulo de erros em células lesadas nos seus DNAs, levando essas células a apoptose, morte programada da célula.⁽⁸⁾ A atividade supressora do tumor pode também ser neutralizada pela interação com outras proteínas ou com oncoproteínas virais.^(4, 15)

A mutação do p53 em câncer cervical é rara. Isto pode ser porque a oncoproteína E6 e E7 do Papiloma Vírus Humano (HPV) de alto risco pode ligar-se à proteína p53 e inativá-la neste tipo de câncer.^(1, 4)

A inativação do p53 frequentemente ocorre como resultado de mutações gênicas causadas pela exposição a mutagênicos químicos, ambientais, agentes físicos como: radiações, raios gama ou infecções virais. Contudo, a inativação do p53 pode também ocorrer esporadicamente através de processos endógenos, e em raros casos, as mutações podem ser inerentes.⁽³²⁾

O controle da proliferação celular é essencial para o crescimento normal das células do organismo, este é estimulado pelos protooncogenes, os quais podem tornar-se oncogenes e resultar em crescimento tumoral. As mutações que inativam os genes supressores de tumor, levam à tumorigênese.⁽³²⁾

Quando ocorre um dano no DNA, o gene TP53 selvagem inibe a mitose e

induz o reparo o qual se não for eficiente induz a apoptose, eliminando deste modo as células instáveis com predisposição à malignidade. Quando ocorre uma mutação no gene TP53, há uma alteração funcional da proteína, a qual sendo inativada leva a uma instabilidade genética dando início à transformação maligna.⁽²⁹⁾

Como citado, no início do ciclo mitótico, o gene p53 ativa o gene p21, induzindo a síntese da proteína p21, cuja função é inibir a ação das quinases dependentes de ciclinas (CDKs), fazendo com que as células parem na fase G1 do ciclo celular, até que se complete o reparo do DNA.

Para tanto, a proteína p53 ativa o gene Growth Arrest DNA Damage (GADD-45), que atua corrigindo a lesão no DNA. Quando o reparo do DNA é finalizado, a proteína p53 é degradada pela ação da proteína MDM-2, produto do gene mouse double minute 2 (mdm-2). Não ocorrendo restauração do DNA, o gene p53 sinaliza para outros genes reguladores, como bax, bcl-2 e c-myc, e induz a apoptose, eliminando, assim, a célula com a informação genética variada. O gene p53 promove, também um ponto de verificação de S para G2, que depende da integridade do domínio C-terminal do gene.^(2, 28)

A mutação do TP53 leva ao acúmulo de proteína no núcleo celular, esta alteração aumenta a meia vida desta proteína permitindo que esta seja detectada por meio de imunohistoquímica.⁽²⁸⁾

Este gene pode ser alterado por várias mutações que ocorrem em vários locais da sua extensão, tais mutações podem ocorrer por diversos agentes mutagênicos. A mutação de um alelo do gene p53 muitas vezes é acompanhada de deleção de outro alelo, resultando em produto protéico inativo.⁽²⁷⁾ A proteína p53 mutante inativa a proteína p53 normal ocasionando perda da função de supressão

tumoral permitindo assim a atividade oncogênica.⁽²⁷⁾

O uso da imunohistoquímica como determinante para o prognóstico da neoplasia de colo uterino é controverso.

A perda de heterozigose do p53 está relacionada com a progressão de certos tipos de tumores. No câncer cervical dois estudos mostraram esta relação. Um estudo de coorte avaliou o polimorfismo no códon 72 do p53. Mutações do p53 foram encontradas em vários tumores humanos e estudos têm mostrado menos de 10% de prevalência da mutação do p53 em câncer cervical.⁽²³⁾

Por duas décadas as principais alterações do p53 foram encontradas no câncer cervical e lesões precursoras, tais como a expressão do p53, mutações perda de heterozigose e polimorfismo no p53.

Pacientes com carcinoma de células escamosas que foram tratadas com radioterapia foram investigados quanto à infecção por HPV, *status* do p53, e outros parâmetros clínicos, estes resultados foram variáveis. Observou-se que a mutação do p53 tem uma significativa correlação com recorrência local do tumor, porém sem correlação com a infecção por HPV ou outro resultado clínico em pacientes com câncer cervical. Tem sido relatada a presença do p53 mutante radioresistente em diferentes tipos de tumores.⁽¹⁹⁾

Surpreendentemente, o câncer cervical HPV positivo não tem mutações freqüentes do p53.⁽¹⁾ O p53 é mais frequentemente mutado em tumores HPV negativos do que em tumores HPV positivos, sugerindo que para a formação do tumor, procede que o p53 deva ser inativado ou por interação de proteínas virais ou por mutação. Uma pequena proporção de câncer cervical não contém HPV detectável.⁽³⁶⁾

Vários estudos sugerem uma possível diferença molecular no caminho da carcinogênese com p53 mutante encontrado em tumores HPV negativos.^(3, 4, 39)

Existe o polimorfismo no códon 72 do gene p53, que pode modificar uma arginina (Arg) ou uma prolina (Pro), determinando três genótipos: Arg (ArgArgp53), heterozigoto (Arg/Pro p53), os dois alelos não interferem na atividade da proteína, porém estudos sugerem que pacientes Arg/Arg p53 têm risco maior de desenvolver o câncer cervical associado ao HPV.

A p53 que possui uma Arg na posição 72 apresenta velocidade de degradação maior do que uma Pro nesta posição e presença do HPV.^(20, 41)

Um modo de inativação do p53, mediada pelo HPV diminui a suscetibilidade das células cancerígenas à apoptose e permite a sobrevivência destas após lesão do DNA ou desenvolvimento de estabilidade genômica, acumulando mudanças genéticas e maior progressão para malignidade.^(3, 38)

A interação entre E6 e p53 representa potencialmente um importante passo para a progressão da maioria das malignidades cervicais.⁽³⁸⁾

Existe um sinergismo dos fatores de risco “clássicos” para câncer cervical com a perda da função do gene supressor de tumor, p53.⁽⁵⁾

Um dos métodos para detecção de mutações do gene p53 é por estudo dos níveis de p53 em células tumorais.⁽⁹⁾

O desenvolvimento de técnicas para detalhar o tumor biológico mais claramente inclui o uso de imunohistoquímica (IH) e técnicas de biologia molecular como PCR, tipagem de vírus, análise de ploidia e hibridização *in situ*.⁽⁴⁰⁾

A detecção das mutações do p53 é importante não somente por estabelecer relação causa-efeito em exposição a doença, mas também para “*screening*” da

população exposta antes do início do câncer.⁽³²⁾

A imunohistoquímica é um método que depende da meia-vida das proteínas do p53 mutantes. Geralmente a proteína p53 reside nos núcleos celulares, mas tem uma meia-vida curta e está presente em tão pequena quantidade que não podem ser detectadas pela IH de rotina.⁽³⁴⁾

As mutações frequentemente aumentam a meia-vida e quantidade da p53, permitindo a sua detecção pela IH.^(1, 4, 13, 32)

As proteínas p53 mutantes acumuladas nos núcleos celulares levam a uma relativa super expressão que pode ser detectada por IH em amostras teciduais congeladas ou parafinada.⁽⁴⁾

A detecção de anormalidades do p53 pode ter implicações diagnósticas, prognósticas e terapêuticas.⁽¹³⁾

Do ponto de vista clínico, a IH do p53 parece ser o método mais prático e útil de detecção de alterações do p53 em lesões pré-cancerosas e carcinomas. Esta técnica permite precisar a localização e identificação de células que inibem alterações do p53, contudo ela não pode detectar a perda completa da p53 ou mutações pequenas.⁽⁷⁾ A IH negativa pode indicar estado de p53 tipo selvagem (ou seja, com função normal) ou gene p53 deletados.

Quando a IH é positiva, está geralmente, mas nem sempre, associada com mutações da p53.⁽⁴³⁾

A IH, a qual identifica antígenos celulares específicos e outras técnicas especializadas, podem fornecer fenótipos mais detalhados e algumas vezes informações clínicas úteis. A correlação com fenótipos tais como grau histológico, ou taxa de proliferação celular, com eventos moleculares precisos tais como alteração

do p53 ou outros genes, promete expandir nosso conhecimento do comportamento e criar novos paradigmas de avaliação de risco, prevenção, detecção precoce, determinação do prognóstico e terapias antineoplásicas.⁽¹³⁾

A IH tem suas limitações, a ausência de marcação não significa ausência de alteração da proteína (falso negativo). Inversamente o acúmulo de proteína não é sinônimo de mutação. A Ausência de expressão pode decorrer de condições adversas de fixação do tecido diminuindo a sensibilidade da técnica. Uma forte positividade na maioria das células tumorais indica uma disfunção da proteína, podendo corresponder a uma mutação ou estabilização por outro mecanismo. Entre as técnicas utilizadas para investigação da inativação da p53 a IH é a mais utilizada.⁽²⁰⁾

A relação de mutações da p53 com o grau do tumor e estadio têm sido avaliados em muitos tipos de tumor. Esta tem sido observada em estadios avançados de câncer de endométrio, cérvix e ovário, indicando que nesses tumores as mutações da p53 podem ser eventos de contribuição tardia para a progressão do tumor ao contrário da mama, por exemplo, no qual as mutações ocorrem em estágios iniciais do tumor.⁽¹³⁾

Embora a mutação do p53 possa ocorrer em estágios clínicos precoces do processo neoplásico, em alguns tipos de câncer, a fração dos tumores com gene p53 alterado é mais alto em estadios mais tardios do tumor.⁽⁷⁾

Muitos estudos examinam o valor prognóstico de mutações do p53 e variedade de câncer. Os dados concluem que pacientes com tumores que apresentam mutação da p53 são piores do que naqueles pacientes com tumor sem mutação.

O valor prognóstico da p53 em câncer cervical tem sido examinado com a conclusão geral de que a p53 está associada com prognóstico desfavorável.⁽⁹⁾

A resistência das células tumorais à radiação e quimioterapia permanece um obstáculo significativo no tratamento do câncer.⁽²²⁾

Estudos descrevem que a terapia do câncer é menos efetiva em pacientes que possuem tumor com mutações da p53. Embora existam exceções, o padrão e frequência de mutações da p53 em vários tipos de tumor correlaciona-se a uma menor resposta do tumor à terapia.⁽²²⁾

Se a citotoxicidade de agentes antineoplásicos é determinada em parte pelo mecanismo p53 dependente, as células que adquirem mutações da p53 são predispostas a uma maior sobrevivência a quimioterapia e a uma maior resistência do tumor. A resistência à agentes antineoplásicos é uma consequência direta da inativação da p53.^(20, 22)

A identificação de mutações da p53 em certos tipos de tumores pode tornar-se um importante fator nas decisões de tratamento. Os agentes que restauram ou mimetizam a função da p53 estão predispostos a ter uma potente atividade antitumor.⁽²²⁾

Assim é possível designar drogas que bloqueiam a divisão celular por mimetizar os efeitos inibitórios da proteína p53. A restauração da função normal do gene p53 parece ser uma proposta promissora para terapia do câncer em geral. O fenótipo tumorigênico poderia ser suprimido *in vitro* e em hospedeiros imunocomprometidos pela restauração da função normal da p53 em células neoplásicas.⁽⁷⁾

Como o p53 é um componente integral do caminho programado de morte

celular (apoptose) induzida pela lesão do DNA, através de drogas quimioterápicas (Qt) e radiações, a inativação da função normal do p53 poderia ter um aumento na resistência à morte celular e redução na sensibilidade das células às drogas de quimioterapia e radiações.^(1, 7, 43)

Essas observações levantam a possibilidade de que mutações na p53 podem proporcionar uma base genética de resistência às drogas, e estudos com p53 podem ser utilizados para prever a resposta dos cânceres a radioterapia e quimioterapia no futuro. Não obstante, um benefício substancial poderá ser conseguido por identificar os cânceres nos quais mutações da p53 não estão presentes e as quais são, portanto possíveis de responder bem a quimioterapia com drogas citostáticas tradicionais. Esses resultados também proporcionam alguns alvos para novas estratégias no tratamento do câncer, isto é, conservação de terapia com gene humano e radioterapia (Rt) e/ou quimioterapia (Qt).⁽⁷⁾

Tentativas de colocar a p53 normal dentro de células cancerígenas, incluindo células cancerígenas cervicais com adenovírus, medida por geneterapia, têm sido relatadas com freqüência “*in vivo*” bem como “*in vitro*”, mas vários problemas existem, principalmente o sistema de distribuição e modulação da expressão da p53.⁽¹⁾

1.2 Neoplasia de colo uterino e fatores clínicos e prognóstico

Considerada problema de saúde pública mundial, a neoplasia de colo uterino possui uma incidência elevada. Embora seja uma doença prevenível, estima-se que 19.000 casos novos de câncer de colo uterino devam ocorrer em 2008, no Brasil.⁽⁶⁾

O câncer cervical pode ser diagnosticado através do estudo citológico da

cérvix uterina, técnica de *Papanicolau*, ou por visualização de lesões na cervix. Uma amostra de biópsia deve ser extraída de qualquer lesão suspeita, porque o exame de *Papanicolau* por vezes apresenta baixa sensibilidade no diagnóstico do câncer.⁽³⁹⁾

Esta classificação foi realizada em 1940 dividindo os achados citológicos em classes que variam de I a V, desde então outras classificações surgiram e atualmente a mais utilizada e atual é classificação do Sistema BETHESDA, Maryland, Estados Unidos. Esta classificação foi revista em 2001.⁽¹⁸⁾

Segundo *Papanicolau*, a Classe I mostra achados normais, II apresenta achados de atipias inflamatórias, ambas correspondem à classificação normal do Bethesda; as classe III mostram atipias que correspondem a alterações de células escamosas de significado indeterminado (ASCUS) sem a presença do HPV. Atipias com a presença do HPV à lesões pré-neoplásicas, ou à lesão intraepitelial de baixo grau (SIL de baixo grau). As classes III em outras classificações correspondem à NIC I (SIL de Baixo grau), II e III (SIL de alto grau), IV a carcinoma *in situ* e V corresponde ao câncer invasivo (Anexo A).

A associação com uso de anticoncepcionais orais mostra ser mais freqüente no adenocarcinoma de colo uterino. O tabagismo é um conhecido fator de risco para câncer cervical, alguns estudos demonstraram uma associação com as SIL de alto grau devido á uma ação direta de metabólitos da nicotina no muco cervical.⁽¹¹⁾

Afeta mulheres multíparas e na perimenopausa, porém sua incidência é evidente na faixa etária de 20 a 29 anos com pico entre 45 e 49 anos.⁽¹⁸⁾

A associação desta neoplasia com o HPV de alto risco tem sido bem documentada, e observou-se que as oncoproteínas E6 e E7 do HPV de alto risco

desregulam a proliferação celular. A Oncoproteína E6 liga-se à proteína p53, através da proteína E6AP, formando o complexo p53-E6AP-E6 que é inativado por via proteolítica dependente da ubiquitina; como não ocorre parada do ciclo celular para o reparo do DNA, o ciclo prossegue com o genoma do vírus integrado ao do hospedeiro.⁽²⁾

O desenvolvimento do câncer no trato genital baixo está associado à infecção por HPV em 95% dos casos de câncer de colo uterino.^(25, 37) Dentre os subtipos de HPV, os de alto risco são oncogênicos e produzem duas proteínas, E6 e E7, que estimulam a transformação celular, como já citado. Essas proteínas se ligam ao p53 e Rb respectivamente.^(1, 25)

A classificação da neoplasia de colo uterino foi elaborada pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) em 1994 e tem como parâmetros o tamanho do tumor na cérvix e/ou sua extensão dentro da pelve. Os estágios IA1 e IA2; o estágio IB em tumores IB1 (tumor <4 cm) e IB2 (tumor >4 cm).

Na América do Norte, quase 60% dos casos são diagnosticados no estágio I, 25% no estágio II, 10% no estágio III, e 5% no estágio IV. Em países menos desenvolvidos, a maioria dos cânceres cervicais são diagnosticados no terceiro ou quarto estágios. Para lesões menores (estágios IA e IB1), a classificação é feita com a medida da profundidade da invasão tumoral (em biópsia cônica), o exame pélvico para verificação clínica do tamanho do tumor, ou ambos. Para tumores mais avançados, o exame pélvico é ocasionalmente necessário para a total verificação dos tecidos parametriaux adjacentes a cervix e corpo uterino.⁽³⁹⁾

O tratamento para o carcinoma invasor do colo uterino, nos estágios IB e IIA pela FIGO, pode ser cirúrgico, pela histerectomia radical com linfadenectomia

pélvica, pela radioterapia primária ou quimiorradiação, tais opções apresentam taxas de sobrevida em cinco anos, variando de 87 a 92%. O exame histopatológico da peça cirúrgica, é importante para estabelecimento do tipo histológico, estadiamento, prognóstico e tratamento da doença.⁽³⁹⁾

O estadiamento cirúrgico de tumores maiores, inclui a avaliação retroperitoneal dos nódulos linfáticos e pélvicos, para identificar metástases. O estadiamento cirúrgico permite a comparação de resultados de tratamento por diferentes métodos terapêuticos em diferentes países. Esta questão é importante porque a maioria dos casos de câncer cervical ocorre em países menos desenvolvidos, onde o acesso à terapia cirúrgica é restrito.

O estadiamento clínico é um indicador prognóstico confiável para pacientes com carcinoma cervical. A expectativa de vida de 5 anos atinge 100% para pacientes com tumores no estágio IA e fica entre 70-85% para aqueles no estágio IB1 e IIA com lesões menores.

Nos tumores locais avançados (estádios IB2 a IV), a expectativa de vida é variável e influenciada pelo volume do tumor, idade do paciente, e por complicações e avanço da doença. No geral, a sobrevida de 5 anos livre de doença é de 50-70% para os estágios IB2 e IIB, 30-50% para o estágio III, e 5-15% para o estágio IV.⁽³⁹⁾

O tratamento para o câncer do útero nos estádios Ia2 e IIA dá-se através da histerectomia radical, técnica que consiste na remoção do útero e do tecido peritumoral (paramétrio, paracolpos e margens vaginais).

Entre 1907 e 1935, várias técnicas surgiram na tentativa de se aumentar a sobrevida das pacientes, porém algumas delas apresentavam taxa de mortalidade peri-operatória. Em 1974, foram descritas outras classes de técnica operatória em

histerectomia visando aumentar a sobrevida e diminuir as complicações das portadoras de neoplasia de colo uterino.⁽³⁰⁾

O prognóstico da paciente com câncer de colo uterino depende de fatores como: idade, estadiamento, tipo histológico do tumor e o seu grau de diferenciação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar A Correlação da expressão do gene p53 em pacientes com carcinoma invasor de colo uterino com fatores clínicos e prognóstico.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a freqüência a alteração da proteína p53 no carcinoma epidermóide de colo uterino.
- Correlação do comportamento biológico do câncer invasivo de colo uterino com a alteração da proteína p53.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Trabalho retrospectivo realizado com pacientes com câncer de colo uterino tratados no setor de Oncologia da disciplina de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina – UNESP, Campus de Botucatu, durante o período de 1985 a 2000. As lâminas dos estudos anátomo-patológicos e imunohistoquímicos foram fornecidas pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, tendo o estudo imunohistoquímico realizado pela Prof^a. Eliane S. de Abreu.

3.1 Casuística

Foram estudados, retrospectivamente, 120 pacientes com carcinoma epidermóide invasivo de colo uterino, diagnosticadas, tratadas e acompanhadas no serviço de Oncologia ginecológica do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Através do levantamento dos prontuários, foram estudados os seguintes dados relativos às pacientes: idade, raça, paridade, coitarca, tabagismo, uso de anticoncepcionais orais, classificação de *Papanicolau*, estadió e expressão da proteína p53.

3.1.1 Dados clínicos

Idade, cor, paridade, uso de contraceptivos orais, tabagismo, coitarca, citologia cérvico-vaginal, grau de diferenciação histológica do tumor, tratamento realizado e *follow-up* (*seguimento*).

3.1.2 Seguimento clínico

Foram avaliados tempo de segmento de cada paciente e o tempo de sobrevida não pôde ser pesquisado porque muitas pacientes abandonaram o seguimento e/ou tiveram óbito em outras cidades.

3.1.3 Dados anátomo-patológicos

- Grau de diferenciação histológica do tumor:
- Pouco diferenciado
- Moderadamente diferenciado
- Muito diferenciado.

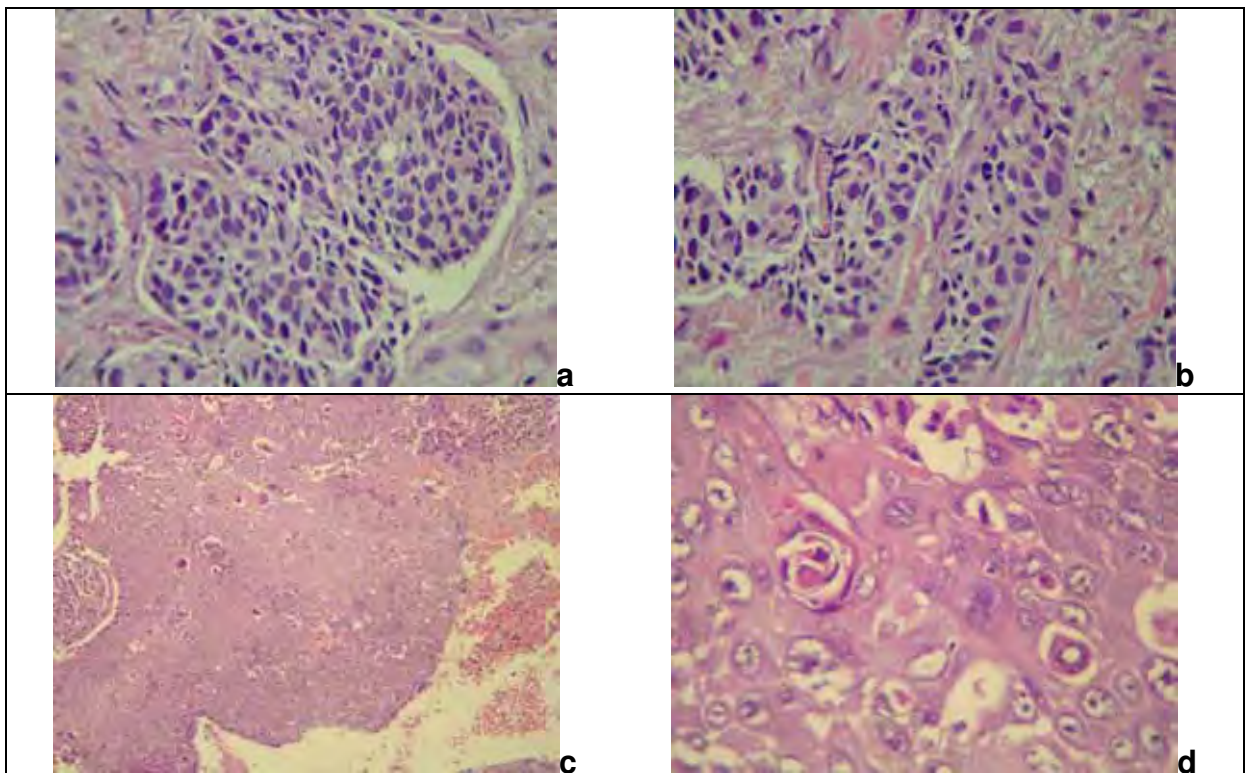


Figura 1 - Carcinoma de célula escamosa a e b) pouco diferenciado; c e d) bem diferenciado.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Expressão da oncoproteína p53

3.2.1.1 Detecção imunohistoquímica da p53

Também conhecida como Complexo Avidina-Biotina (ABC), a técnica da Avidina-Biotina-Peroxidase é técnica imunohistoquímica utilizada na detecção da p53. É fundamentada na grande afinidade da avidina (glicoproteína de alto peso molecular) com a biotina (vitamina que pode ser conjugada a enzimas, anticorpos e substâncias fluorescentes). O tecido é incubado em um anticorpo primário (mono ou policlonal) específico para a proteína em estudo. A seguir aplica-se um anticorpo secundário previamente ligado a uma molécula de biotina, cada molécula de avidina que se acopla à biotina do anticorpo secundário liga-se à outras três moléculas de biotina conjugadas à peroxidase. A peroxidase atua sobre um corante e os sítios antigênicos ficam corados de forma estável, geralmente em tonalidade castanha.

No presente estudo, utilizamos o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) com modificações,⁽¹⁷⁾ com o auxílio do método de recuperação antigênica pelo forno de microondas, como descrito a seguir.

Os tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina foram cortados com 3 micra de espessura e montados em lâminas de vidro previamente preparadas com o adesivo poli-l-lisina (Sigma Chemical Corporation, P-7886, Saint Louis, Missouri, EUA) para evitar o descolamento dos cortes durante a imunocoloração. Em seguida, os cortes foram desparafinizados em xilol por 5 minutos (3 banhos), hidratados em álcool etílico absoluto (4 banhos) e lavados com solução salina tamponada (SST)

em pH7,4 por 5 minutos. Posteriormente, os cortes forma testados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% diluído em SST por 5 minutos para bloqueio da peroxidase endógena.

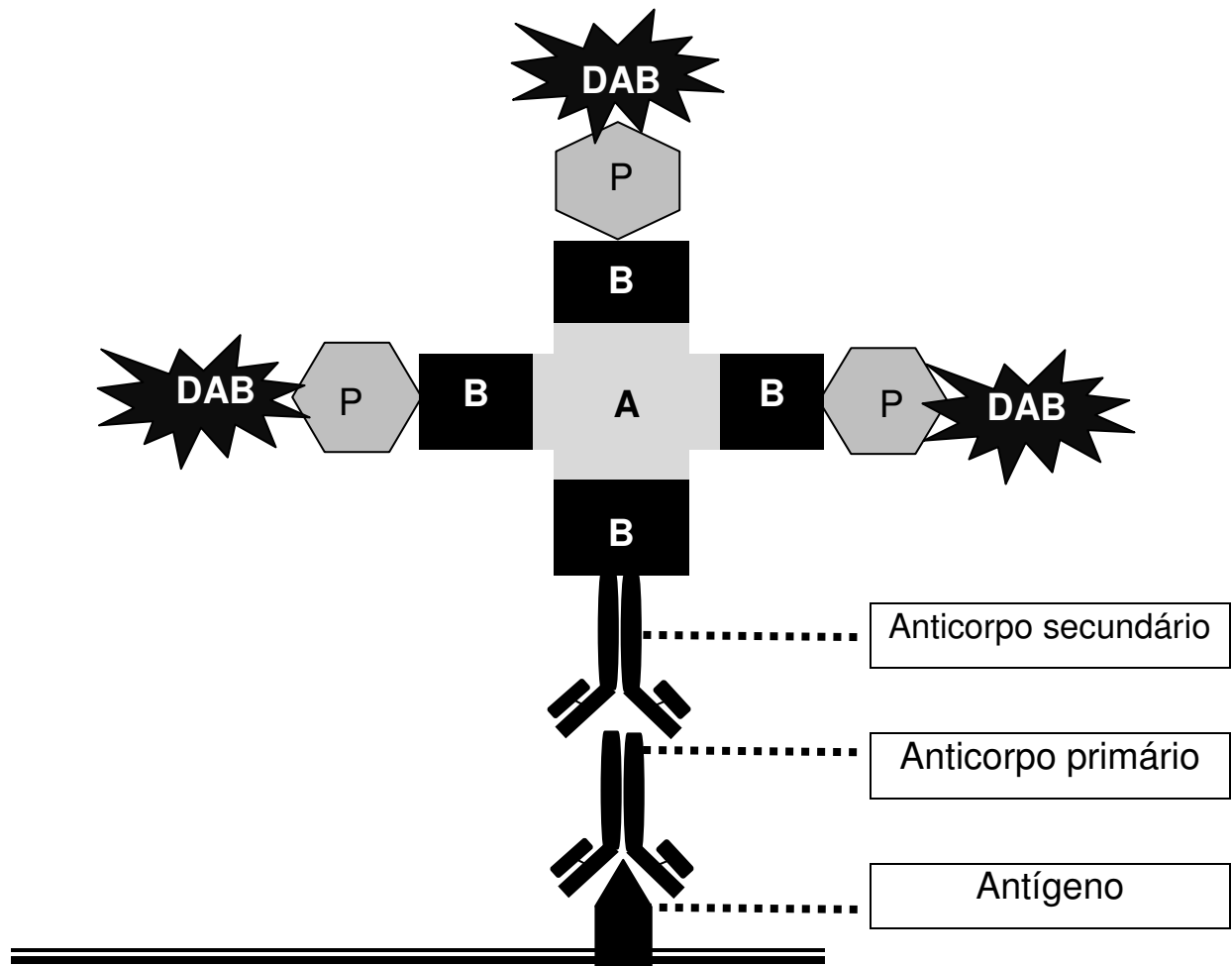


Figura 2 - Representação esquemática do princípio da imunohistoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase. Observa-se o efeito amplificador da avidina (A) que se liga à biotina (B) do anticorpo secundário e a outras três moléculas de biotina. A peroxidase (P) reage com a 3-3' – diaminobenzidina (DAB) corando os sítios antigênicos. ⁽³³⁾

Utilizamos o método de recuperação de epítomos pelo calor (SST de citrato com pH 6,4 por 15 minutos em forno de microondas caseiro SHARP, modelo

Interactive Touch On a 900 Watts para a pesquisa da proteína p53. Os cortes foram incisados com anti corpo primário anti p53 na diluição 1:500 em média por 16 horas, incluindo o período noturno. No dia seguinte, após lavagem em SST, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado anti camundongo, na diluição de 1:160 para o anticorpo (Vector Corp., Burlingame, USA). A seguir, realizou-se incubação por 45 minutos com complexo ABC na proporção de 1 gota do reagente A (Avidina) e uma do reagente B (biotina ligada a peroxidase) na diluição de 5 ml de solução TRIS. Para visualização da reação, os cortes foram tratados com solução de DAB (3-3) – tetrahidrocloreto de diaminabenzidina na concentração de 1 mg/ml de solução tampão trizma e solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 5 minutos. Os cortes foram então contracolorados com hematoxilina de Harris por 20 segundos desidratadas em gradientes sucessivos de álcool, com montagem final com Permount e lamínula.

Todos os passos da reação imunohistoquímica foram realizados à temperatura ambiente, com exceção da incubação no forno de microondas. Entre cada passo da reação, as lâminas foram lavadas várias vezes com SST (pH=7,4).

A reação foi considerada positiva quando a imunorreatividade em padrão nuclear esteve presente.

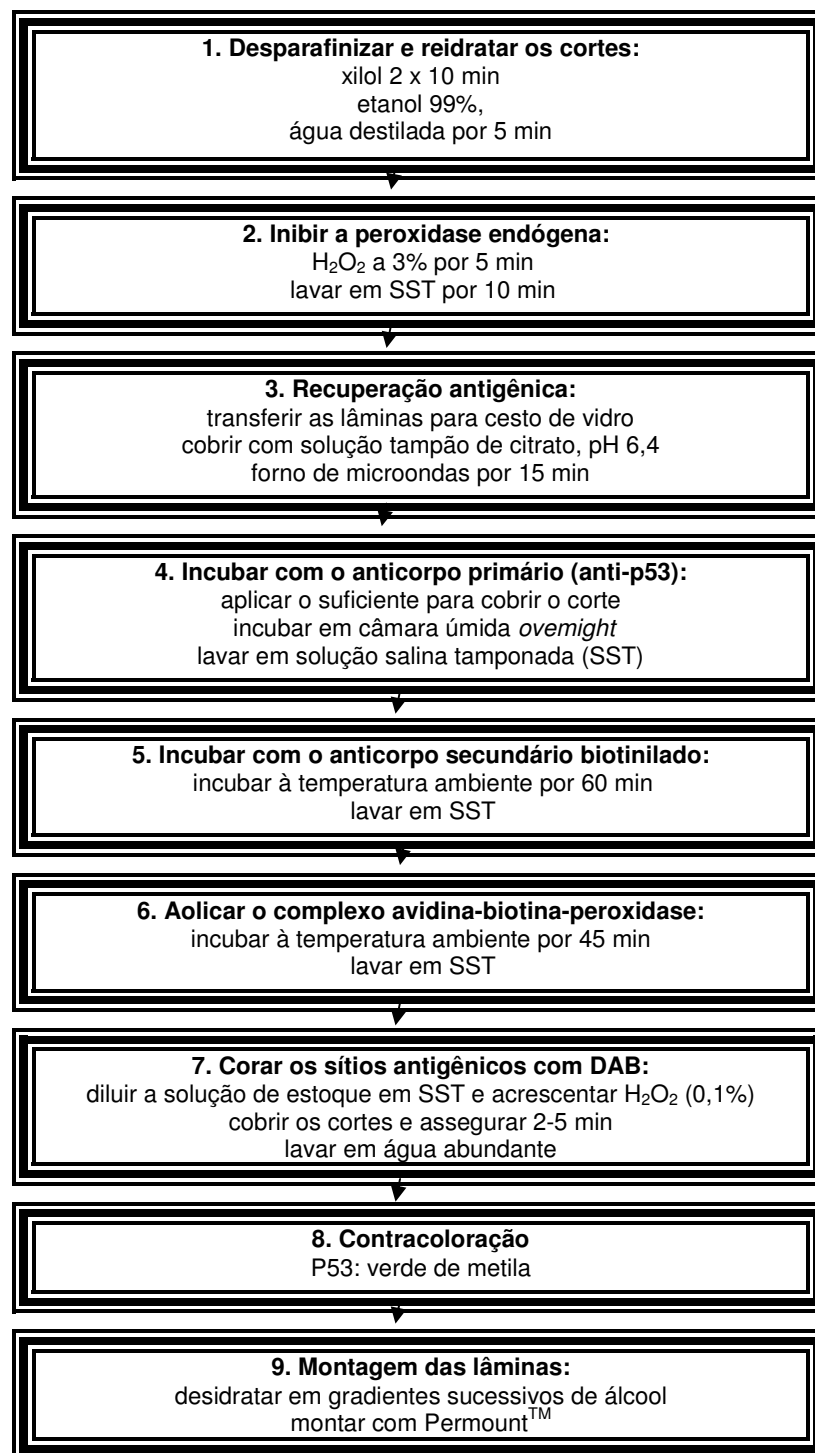


Figura 3 - Fluxograma do protocolo básico de imunohistoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase (ABC) para detecção da expressão da proteína p53.⁽³³⁾

3.2.1.2 Interpretação das reações de imunohistoquímica

Avaliadas por microscópio óptico com 200 x de aumento, pelo examinador de cortes histológicos de câncer de colo uterino invasor. Para todos os marcadores pesquisados, foi feita análise semiquantitativa. Os resultados da expressão protéica foram registrados como positiva ou negativas. Quando positiva, a expressão protéica foi graduada 1+ a 4+, o que corresponde aos graus de 1 a 4.⁽³³⁾

+/4+: expressão da proteína em menos de 10% das células.

++/4+: expressão da proteína em 11-25% das células.

+++/4+: expressão da proteína em 26-50% das células.

++++/4+: expressão da proteína em mais de 50% das células

A quantificação foi realizada pelo estudo de pelo menos 1000 células em 10 campos com aumento de 200 vezes de aumento (figura 4).

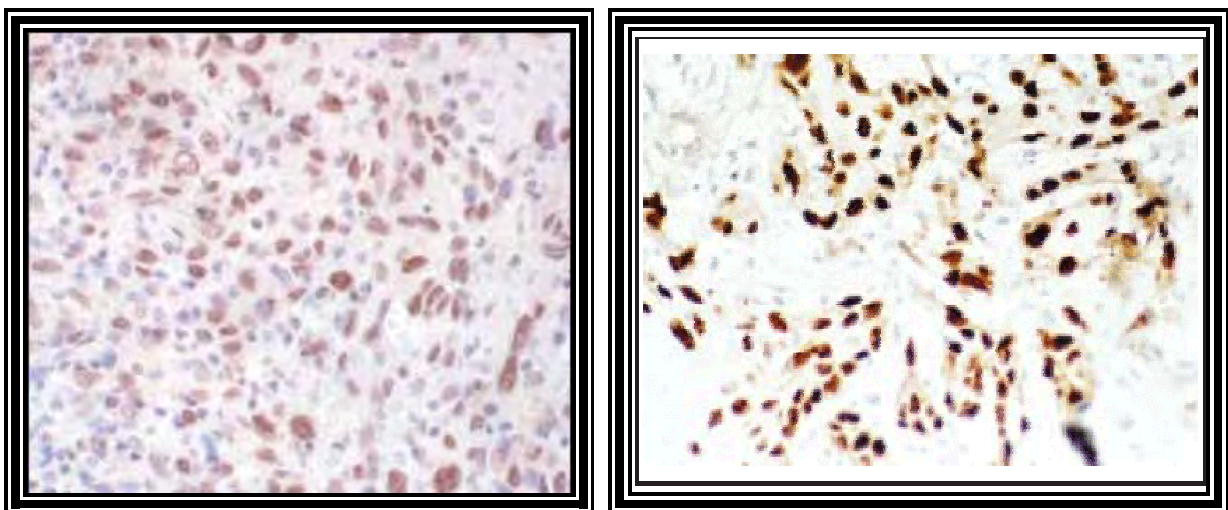


Figura 4 - Demonstração de p53 em lâmina.

3.3 Análise estatística

Foram apresentadas tabelas de freqüência de algumas variáveis e realizados testes de Fisher para testar associações entre p53 e as variáveis.

Foram considerados estatisticamente significativos os resultados cujos valores de p53 foram inferiores a 0,05.^(12, 24)

4 RESULTADOS

4.1 Idade

A mediana de idade do estudo foi de 46 anos e a média de 46 a 48 anos, variação de 23 a 78 anos; estando a distribuição etária das pacientes representada na tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo idade.

Idade	Número	Percentual
20-29	3	2,5 %
30-39	26	21,7 %
40-49	63	52,5 %
50-59	14	11,7 %
60-69	8	6,7 %
Acima de 70	6	5,0 %
TOTAL	120	100,0 %

4.2 Etnia

A tabela 2 representa a distribuição das pacientes segundo a etnia.

Tabela 2 - Distribuição por etnia.

Etnia	Número	Percentual
Branco	99	82,5 %
Mulato	13	10,8 %
Negro	8	6,7 %
TOTAL	120	100,0%

4.3 Paridade

A tabela 3 representa a distribuição das pacientes segundo a paridade.

Tabela 3 - Distribuições de frequências absolutas e relativas das pacientes segundo a paridade.

Paridade	Número	Percentual
Nulípara	0	0,0 %
Primípara	5	4,1 %
Secundípara	26	21,7 %
Tercípara	12	10,0 %
Múltipara (P > 3)	77	64,2 %
TOTAL	120	100,0 %

4.4 Coitarca

A tabela 4 representa a distribuição das pacientes segundo a idade de coitarca.

Tabela 4 - Distribuição de frequências absolutas e relativas das pacientes segundo a idade a coitarca.

Coitarca (idade)	Número	Percentual
Antes dos 15	14	11,7 %
15-20	82	68,3 %
Após os 20	24	20,0 %
TOTAL	120	100,0%

4.5 Tabagismo

A distribuição das pacientes quanto ao uso do tabaco encontra-se expressa na tabela 5.

Tabela 5 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo o uso do tabaco.

Tabagismo	Número	Percentual
Sim	47	39,2 %
Não	73	60,8 %
TOTAL	120	100,0 %

4.6 Anticoncepcional oral

A distribuição das pacientes quanto ao uso de anticoncepcional oral (ACO) encontra-se expressa na tabela 6.

Tabela 6 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo o uso de ACO.

Aco	Número	Percentual
Sim	49	40,8 %
Não	71	59,2 %
TOTAL	120	100,0 %

4.7 Citologia

A tabela 7 representa a distribuição de freqüências das pacientes segundo a citologia cérvico-vaginal (Anexo A).

Tabela 7 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo a citologia cérvico-vaginal, segundo a classificação de Papanicolau.

Citologia	Numero	Percentual
III	4	3,3 %
IV	10	8,3 %
V	106	88,4 %
TOTAL	120	100,0 %

4.8 Histologia

A distribuição de freqüências das pacientes segundo o grau de diferenciação histológico de neoplasia de colo uterino encontra-se representada na tabela 8.

Tabela 8 - Distribuição de freqüências das pacientes segundo o grau de diferenciação do tumor.

Histologia	Número	Percentual
Bem Diferenciado	30	25,0 %
Moderadamente Diferenciado	59	49,2 %
Pouco Diferenciado	31	25,8 %
TOTAL	120	100,0 %

4. 9 Estadiamento

A tabela 9 representa a distribuição de freqüências das pacientes segundo o estágio da classificação da FIGO, 1994 (Anexo B).

Tabela 9 - Distribuição de freqüências das pacientes segundo o estadio.

Estadio	Número	Percentual
I	41	34,2 %
II	53	44,2 %
III	19	15,8 %
IV	7	5,8 %
TOTAL	120	100,0 %

4.10 Tratamento

A tabela 10 representa a distribuição de freqüências das pacientes segundo o tratamento realizado. Sendo observado um percentual de 2,5 para o Histerectomia Abdominal Total (HTA), Salpingo-ooforectomia bilateral (SOB), Wertheim-Meigs (WM), Radioterapia (Rt) e Quimioterapia (Qt). anticoncepcional oral (ACO)

Tabela 10 - Distribuição de freqüências das pacientes segundo o tratamento.

Tratamento	Número	Percentual
HTA	3	2,5 %
HTA + SOB	1	0,8 %
HTA + SOB+ +Rt	6	5,0 %
WM	29	24,2 %
WM+ Rt	10	8,3 %
WM + Qt	1	0,8 %
WM+ Rt + Qt	1	0,8 %
Rt	63	52,5 %
Rt+Qt	4	3,3 %
Qt	2	1,7 %
TOTAL	120	100,0 %

4.11 Seguimento

A distribuição de freqüências das pacientes segundo o seu seguimento está representada na tabela 11.

Tabela 11 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo o seguimento.

Seguimento (anos)	Número	Percentual%
0-5	14	11,7 %
5-10	17	14,2 %
+10	89	74,3 %
TOTAL	120	100,0 %

Quando correlacionamos as variáveis com a presença do p53, vemos os dados abaixo relacionados.

4.12 Expressão do p53

A distribuição de freqüências das pacientes quanto à expressão do p53 encontra-se representadas na tabela 12 e gráfico 1.

Tabela 12 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo o p53.

p53	Número	Percentual %
Positivo	107	89,2 %
Negativo	13	10,8 %
TOTAL	120	100,0 %

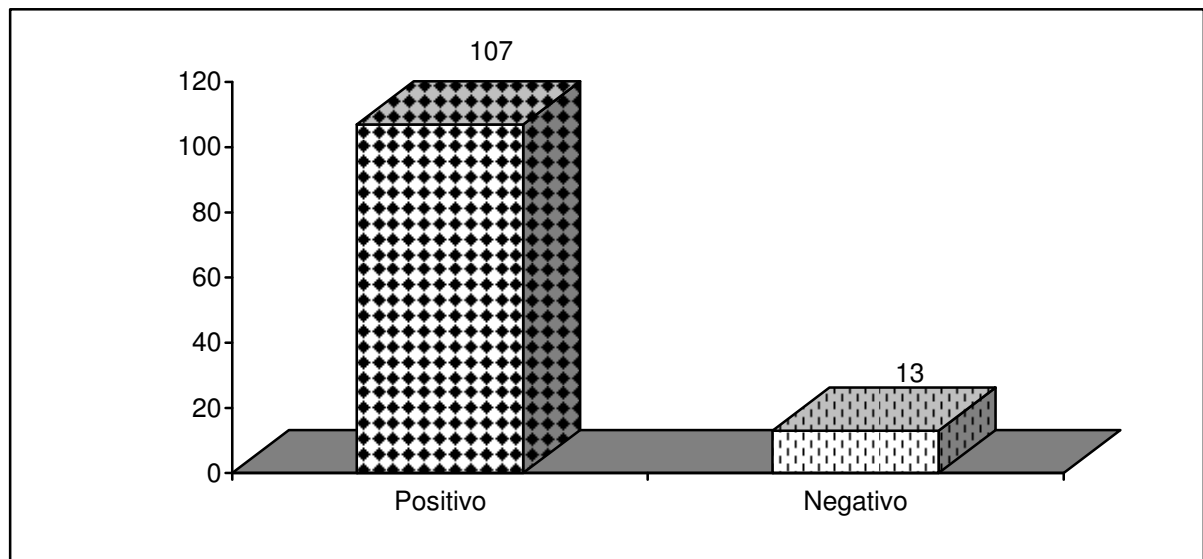


Gráfico 1 – Distribuição quanto às freqüências do p53.

4.13 Graduação do p53

A distribuição de freqüências das pacientes segundo a graduação do p53, encontra-se representada na tabela 13.

Tabela 13 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas segundo a graduação do p53.

GRADUAÇÃO	NÚMERO	PERCENTUAL
+ / 4+	48	45,3 %
++ / 4+	28	26,4 %
+++ / 4+	26	24,5 %
4+	4	3,8 %
TOTAL	106	100,0 %

OBS.: Uma das lâminas não foi possível graduar devido ao material exíguo.

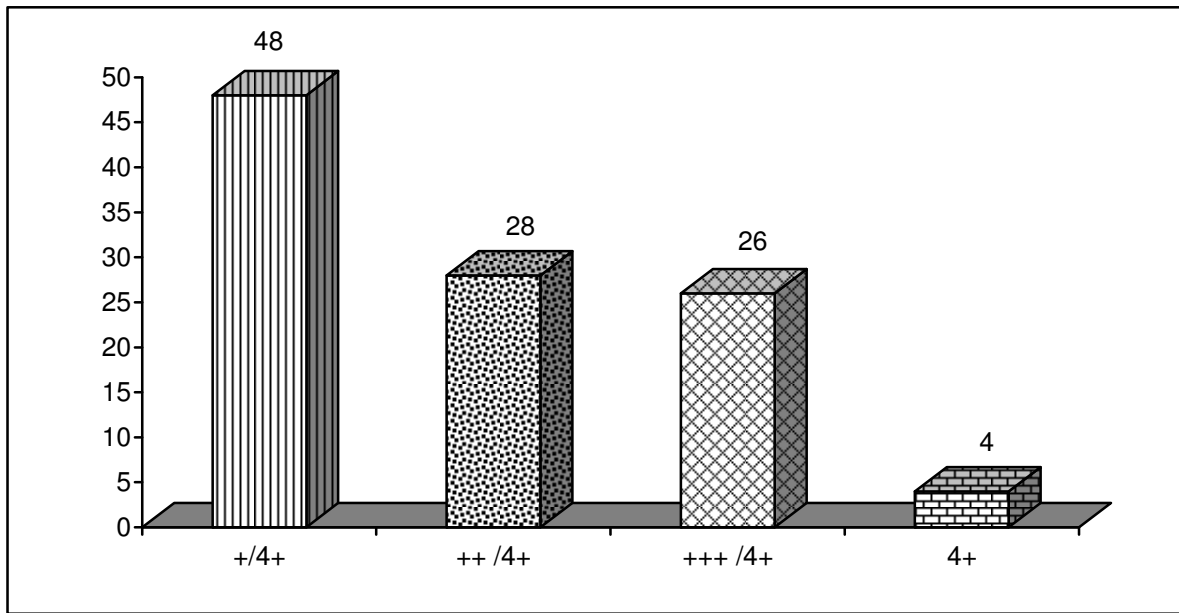


Gráfico 2 - Distribuição quanto à graduação do p53.

4.14 Associação entre p53 e idade

A distribuição de freqüências das pacientes correlacionando p53 e idade, encontra-se representada na tabela 14.

Tabela 14 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo p53 e idade.

Idade	p53	
	Positivo	Negativo
20-29	1 (0,8%)	2 (1,7%)
30-39	24 (20,0%)	2 (1,7%)
40-49	56 (46,7%)	7 (5,8%)
50-59	13 (10,8%)	1 (0,8%)
60-69	7 (5,8%)	1 (0,8%)
70 ou mais	6 (5,0%)	0 (0,0%)
TOTAL	107	13

$p=0,161$ pelo teste exato de Fisher. Não houve associação.

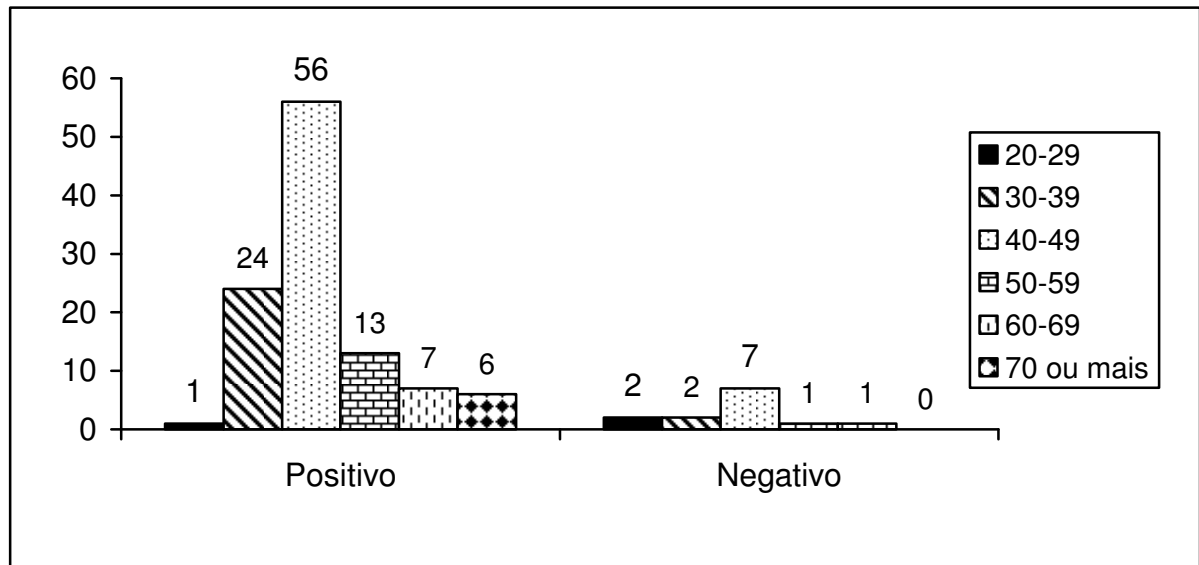


Gráfico 3 - Distribuição quanto à relação do p53 e a idade.

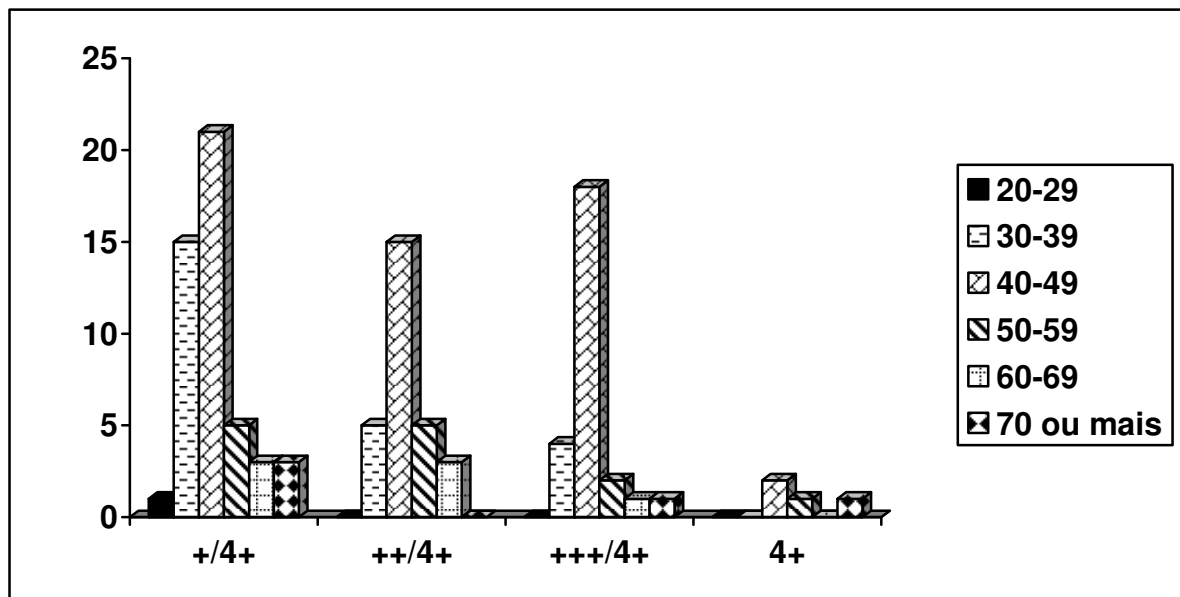
4.15 Associação entre a graduação do p53 e idade

A distribuição de freqüências das pacientes correlacionando graduação do p53 e a idade, encontra-se representada na tabela 15.

Tabela 15 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo a graduação do p53 e a idade

Idade	p53				Total
	+/4+	++/4+	+++4/+	4+	
20-29	1(0,9%)	0 (0,0%)	0(0,0%)	0 (0,0%)	1
30-39	15(14,2%)	5 (4,7%)	4 (3,8%)	0 (0,0%)	24
40-49	21(19,8%)	15(14,2%)	18(17,0%)	2 (1,9%)	56
50-59	5 (4,7%)	5 (4,7%)	2 (1,9%)	1 (0,9%)	13
60-69	3 (2,8%)	3 (2,8%)	1 (0,9%)	0 (0,0%)	7
70 ou mais	3 (2,8%)	0 (0,0%)	1 (0,9%)	1 (0,9%)	5
TOTAL	48	28	26	4	106

$p=0,404$ pelo teste exato de Fisher. Portanto, não houve associação entre graduação do p53 e a idade.



Gráfica 4 - Distribuição quanto à relação da graduação do p53 e idade.

4.16 Associação entre p53 e cor

A relação de freqüências das pacientes correlacionando p53 e cor, encontra-se na tabela 16.

Tabela 16 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo p53 e cor.

p53	Cor			Total
	Branca	Mulata	Negra	
POSITIVO	86 (71,7%)	13 (10,8%)	8 (6,7%)	107 (89,2%)
NEGATIVO	13 (10,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	13 (10,8%)
TOTAL	99	13	8	120 (100%)

p=0,405 pelo teste exato de Fisher. Não houve associação entre p53 e cor.

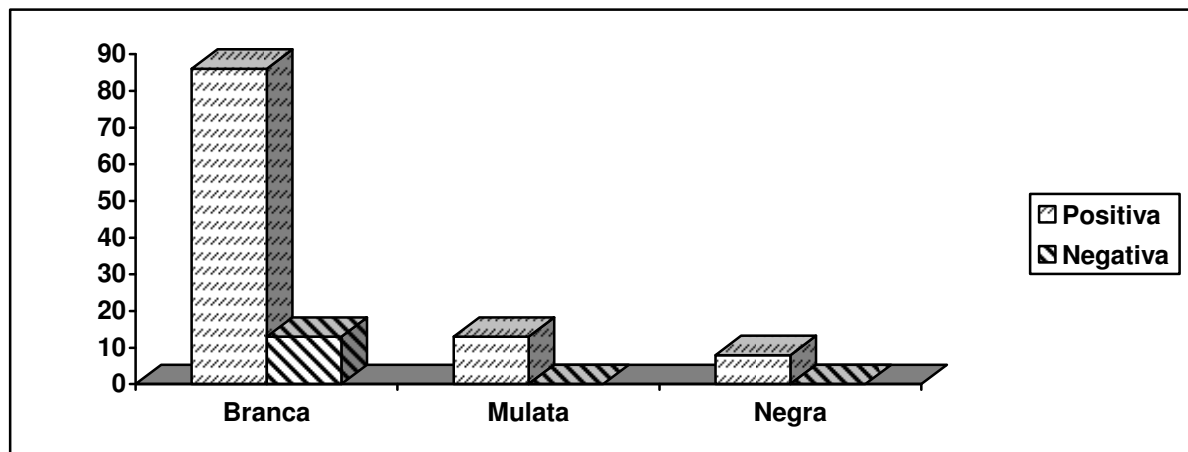


Gráfico 5 - Distribuição quanto à relação do p53 e cor.

4.17 Associação da graduação de p53 e cor

A distribuição de freqüências das pacientes correlacionando a graduação da p53 e etnia, encontra-se representada na tabela 17.

Tabela 17 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo graduação da p53 e etnia.

COR	p53				TOTAL
	+/4+	++/4+	+++/4+	4+	
Branca	38 (35,9%)	21(19,8%)	22 (20,8%)	4 (3,4%)	85
Mulata	7 (6,6%)	5 (4,7%)	1(0,9%)	0 (0,0%)	13
Negra	3 (2,8%)	2 (1,9%)	3 (2,8)	0 (0,0%)	8
TOTAL	48	28	26	4	106

p=0,689 pelo teste exato de Fisher. Não houve associação entre graduação da p53 e etnia.

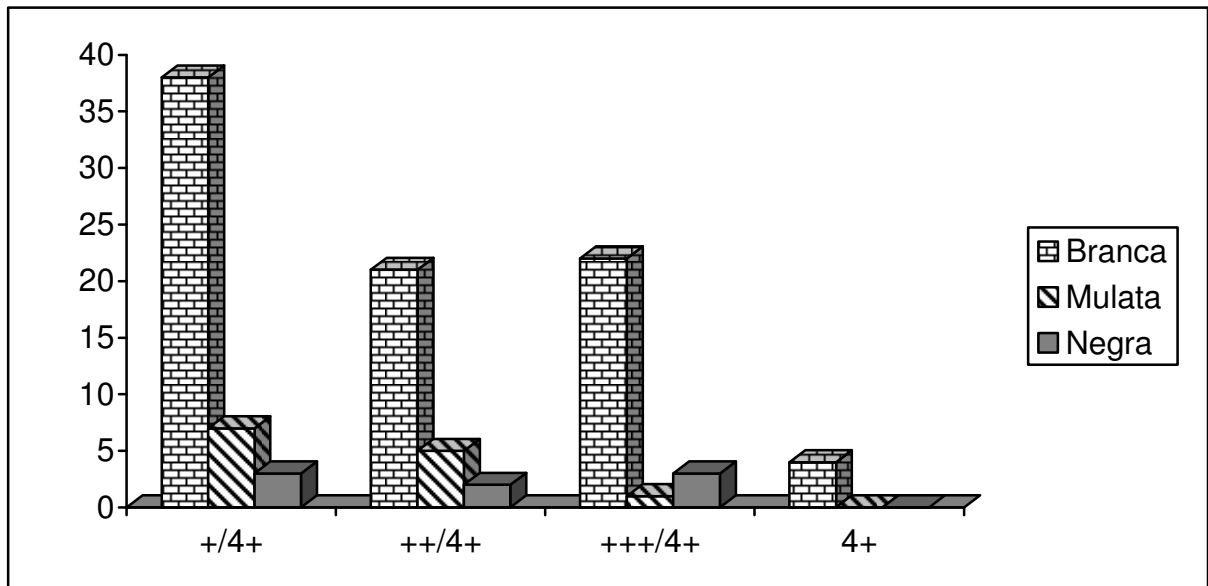


Gráfico 6 - Distribuição quanto à relação graduação da p53 e etnia.

4.18 Associação do p53 e tabagismo

A distribuição de freqüências das pacientes correlacionando a graduação da p53 e o uso do tabaco, encontra-se representada na tabela 18

Tabela 18 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo graduação da p53 e o uso de tabaco.

p53	TABAGISMO		
	SIM	NÃO	TOTAL
POSITIVO	44 (36,7%)	63 (52,5%)	107
NEGATIVO	3 (2,5%)	10 (8,3%)	13
TOTAL	47	73	120

$p=0,244$ pelo teste exato de Fisher. Não houve associação entre a expressão do p53 e uso de tabaco.

4.19 Associação da graduação do p53 e tabagismo

A tabela 19 representa a graduação da p53 em relação o uso do tabaco.

Tabela 19 – Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo a graduação da p53 e tabagismo.

TABAGISMO	p53				TOTAL
	+/4+	+/+/4+	+/+/+/4+	4+	
SIM	23 (21,7%)	13 (12,3%)	7 (6,6%)	1 (0,9%)	44
NÃO	25 (23,6%)	15 (14,2%)	19 (17,9%)	3 (2,8%)	62
TOTAL	48	28	26	4	106

$p=0,287$ teste exato de Fisher. Não houve associação entre a graduação da expressão do p53 e tabagismo.

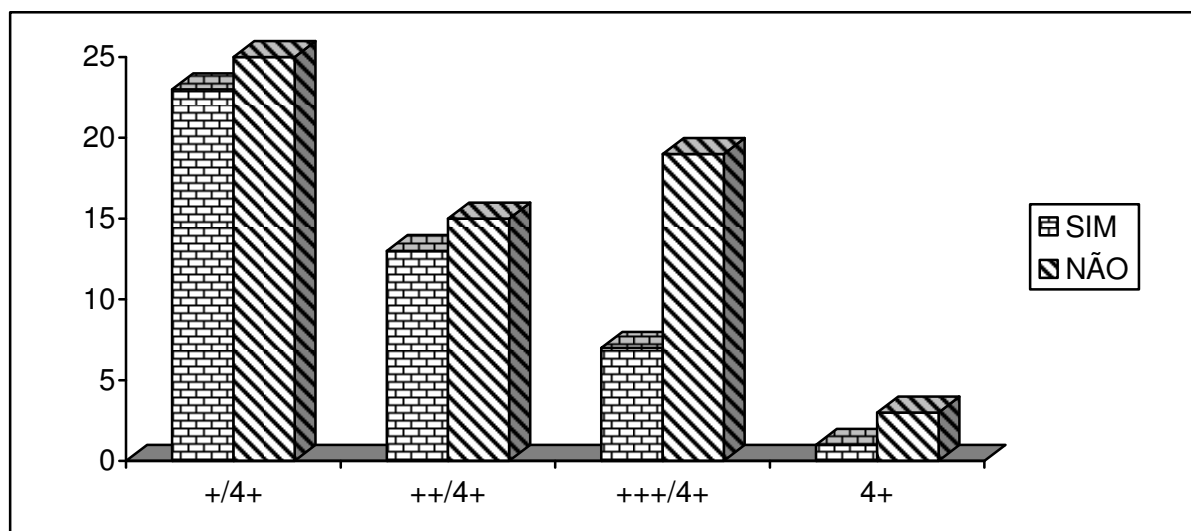


Gráfico 7 - Distribuição quanto à relação graduação da p53 e tabagismo.

4.20 Associação entre a expressão do p53 e paridade

A distribuição de freqüências das pacientes correlacionando a expressão do p53 e paridade encontra-se representada na tabela 20.

Tabela 20 - Distribuições de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo p53 e paridade.

p53	PARIDADE					
	Nulípara	Primípara	Secundípara	Tercípara	Múltipara	TOTAL
POSITIVO	0 (0,0%)	5 (4,2%)	23 (19,2%)	11(9,2%)	68(56,7%)	107
NEGATIVO	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (2,5%)	1 (0,8%)	9 (7,5%)	13
TOTAL	0	5	26	12	77	120

p=1,0 pelo teste exato de Fisher. Não houve associação entre p53 e paridade.

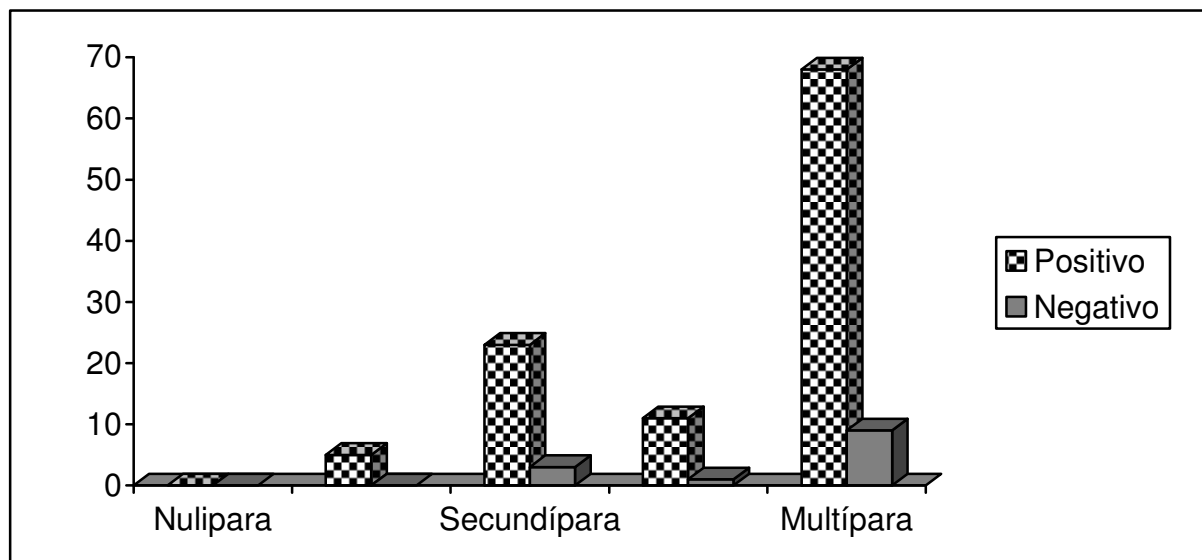


Gráfico 8 - Distribuição quanto à relação do p53 e paridade.

4.21 Associação entre graduação do p53 e paridade

A distribuição de freqüências das pacientes correlacionando p53 com a paridade encontra-se representada na tabela 21.

Tabela 21 - Distribuições de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo a graduação da p53 e paridade.

PARIDADE	p53				TOTAL
	+/4+	+/+/4+	+/+/+/4+	4+	
Nulípara	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0
Primípara	2 (1,9%)	2 (1,9%)	1 (0,9%)	0 (0,0%)	5
Secundípara	10 (9,4%)	5 (4,7%)	7 (6,6%)	1 (0,9%)	23
Tercípara	4 (3,8%)	3 (2,8%)	3 (2,8%)	1 (0,9%)	11
Múltipara	32 (30,2%)	18 (17,0%)	15 (14,2%)	2 (1,9%)	67
TOTAL	48	28	26	4	106

$p > 0,942$ pelo teste exato de Fisher. Não houve associação entre p53 e paridade.

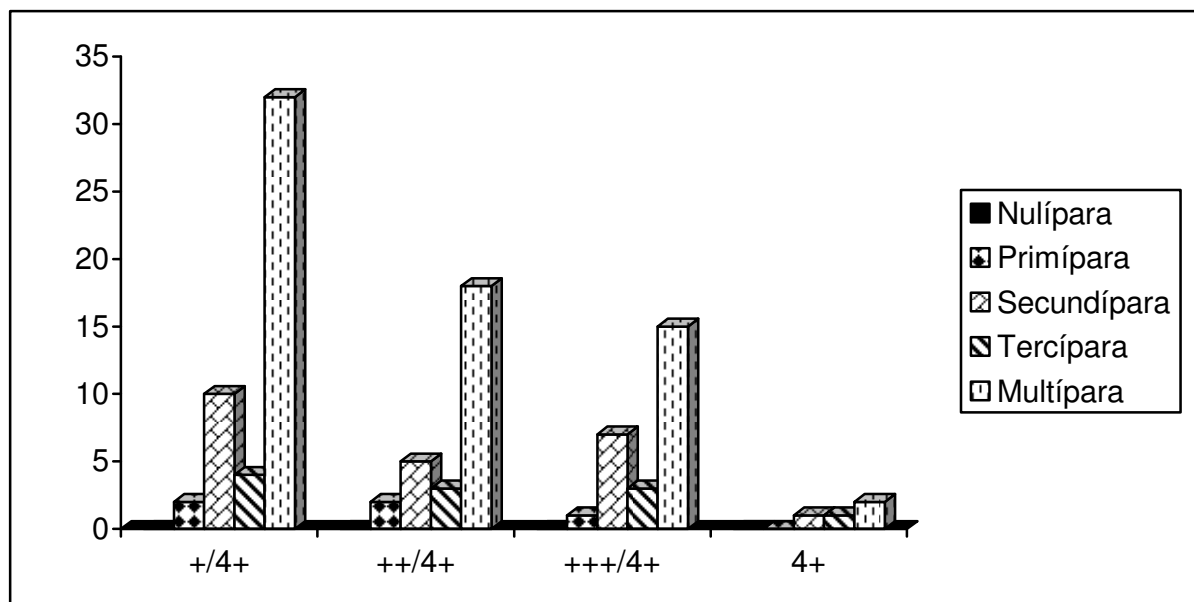


Gráfico 9 - Distribuição quanto à relação graduação p53 e paridade.

4.22 Associação entre a expressão p53 e idade da coitarca

A distribuição de freqüências das pacientes correlacionando a expressão positiva ou negativa do p53 e a idade da coitarca encontra-se representada na tabela 22.

Tabela 22 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo a expressão do p53 e a idade da coitarca.

p53	COITARCA (IDADES)			
	Antes dos 15	15-20	Após os 20	TOTAL
POSITIVO	12 (10,0%)	77 (64,2%)	18 (15,0%)	107
NEGATIVO	2 (1,7%)	5 (4,2%)	6 (5,0%)	13
TOTAL	14	82	24	120

$p=0,024$ pelo teste exato de Fisher. Há indício de associação entre a idade da coitarca e a expressão do p53.

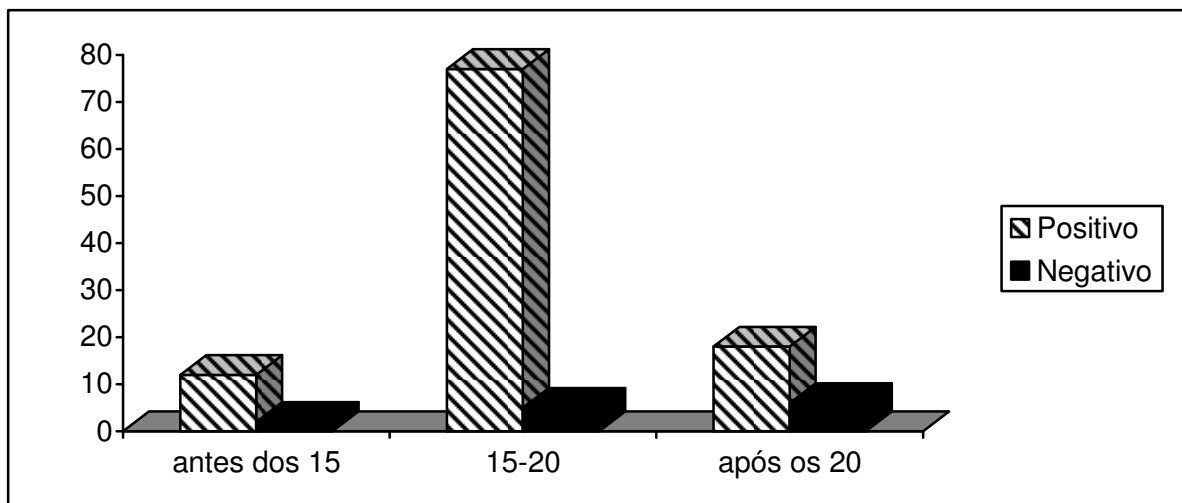


Gráfico 10 - Distribuição quanto à relação do p53 e a Idade da coitarca.

4.23 Associação entre a graduação do p53 e idade da coitarca

A distribuição de freqüências das pacientes correlacionando a graduação do p53 e a idade da coitarca encontra-se representada na tabela 23.

Tabela 23 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo a graduação da p53 e a idade da coitarca.

COITARCA	p53				TOTAL
	+/4+	+/+/4+	+/+/+/4+	4+	
< 15	6 (5,7%)	3 (2,8%)	3 (2,8%)	0 (0,0%)	12
15-19	36 (34,0%)	20 (18,9%)	19 (17,9%)	2 (1,9%)	77
>20	6 (5,7%)	5 (4,7%)	4 (3,8%)	2 (1,9%)	17
TOTAL	48	28	26	4	106

$p=0,716$ pelo teste exato de Fisher. Não houve associação.

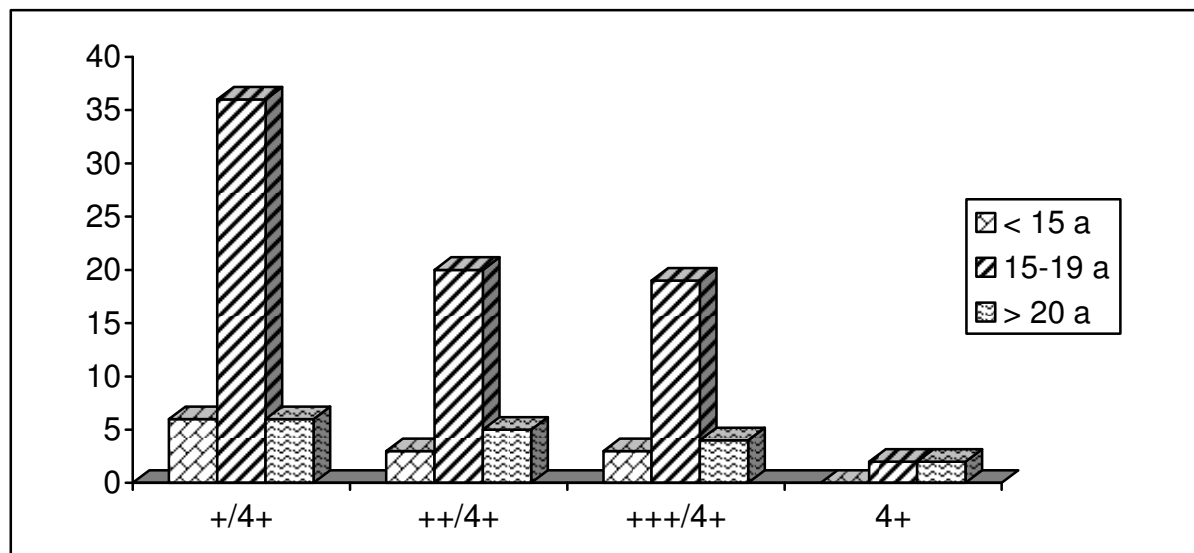


Gráfico 11 - Distribuição quanto à relação graduação do p53 e idade da coitarca.

4.24 Associação entre a expressão do p53 e seguimento

A distribuição de freqüências das pacientes correlacionando a expressão do p53 e seguimento da doença encontra-se representada na tabela 24.

Tabela 24 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo p53 e seguimento

p53	Seguimento em anos				TOTAL
	<1	1-5	5-10	>10	
POSITIVO	12 (10,0%)	52 (43,3%)	17 (14,2%)	26 (21,7%)	107
NEGATIVO	2 (1,7)	7 (5,8%)	2 (1,7%)	2 (1,7%)	13
TOTAL	14	59	19	28	120

p=0,918 pelo teste exato de Fisher. Não houve associação.

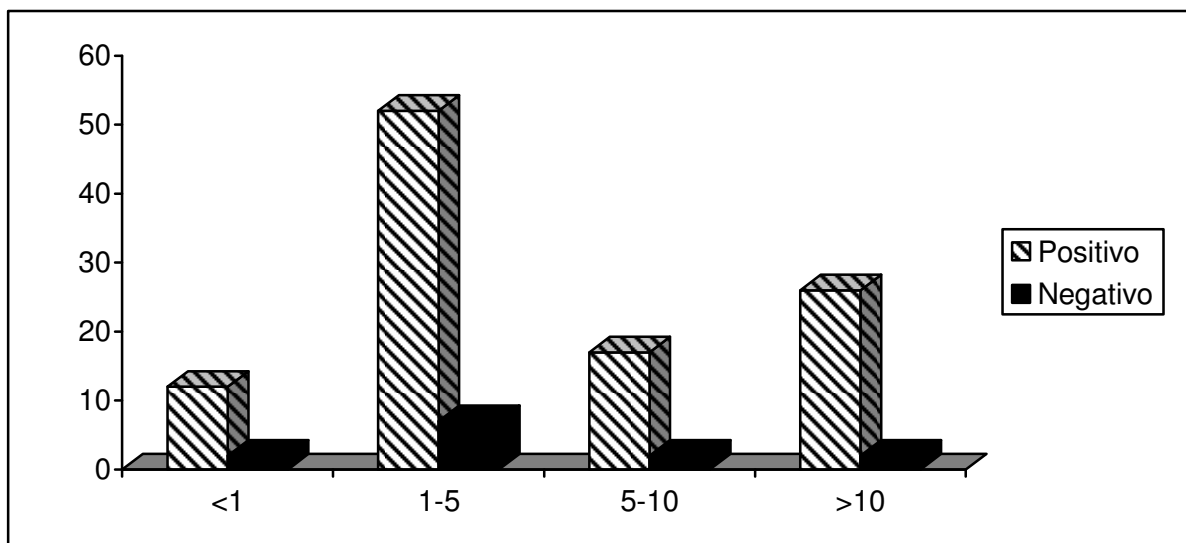


Gráfico 12 - Distribuição quanto à relação do p53 e seguimento.

4.25 Associação do p53 e uso de anticoncepcional oral

A distribuição de freqüências das pacientes correlacionando a expressão positiva ou negativa do p53 e o uso de pílulas encontra-se representada na tabela 25.

Tabela 25 - Distribuição de frequências absolutas e relativas das pacientes segundo a expressão do p53 e o uso de anticoncepcional oral.

p53	ANTICONCEPCIONAL ORAL		
	NÃO	SIM	TOTAL
NEGATIVO	7 (5,8%)	6 (5,0%)	13
POSITIVO	64 (53,3%)	43 (35,8%)	107
TOTAL	71	49	120

$p=0,768$ pelo teste exato de Fisher. Não houve associação entre p53 e o uso de anticoncepcional oral.

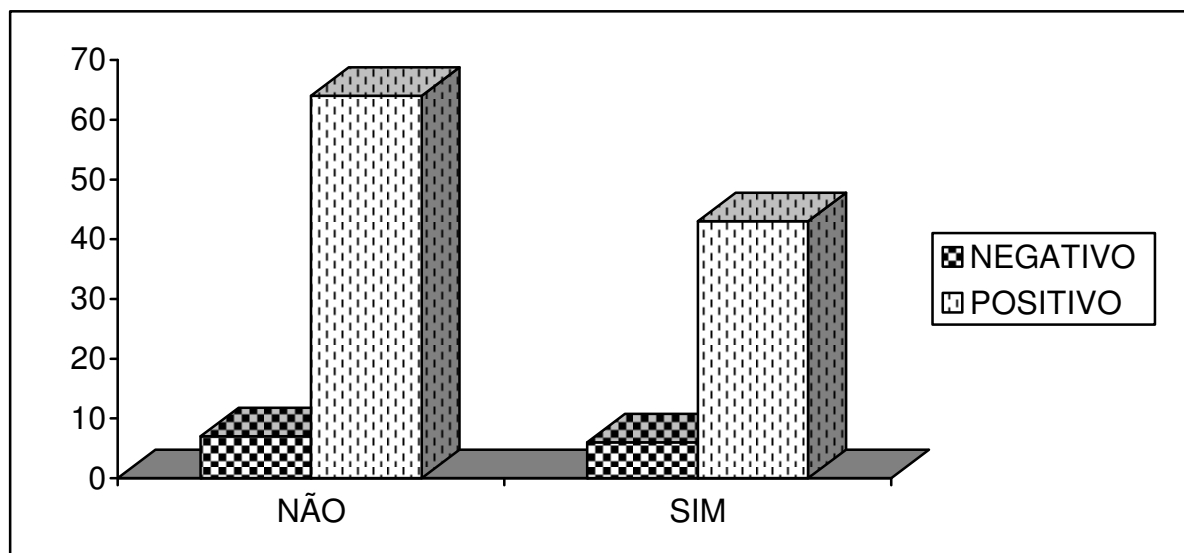


Gráfico 13 - Distribuição quanto à associação do p53 e o uso do anticoncepcional oral.

4.26 Associação entre p53 e estadio

A tabela 26 representa a expressão do p53 em relação ao estadiamento da doença.

Tabela 26 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo p53 e o estadio.

p53	ESTADIO				
	I	II	III	IV	TOTAL
NEGATIVO	10 (8,3%)	1 (0,8%)	0 (0,0%)	2 (1,7%)	13
POSITIVO	31(25,8%)	52 (43,3%)	19 (15,8%)	5 (4,2%)	107
TOTAL	41	53	19	7	120

p=0,001 pelo teste de Fisher. Houve associação entre p53 e estadio.

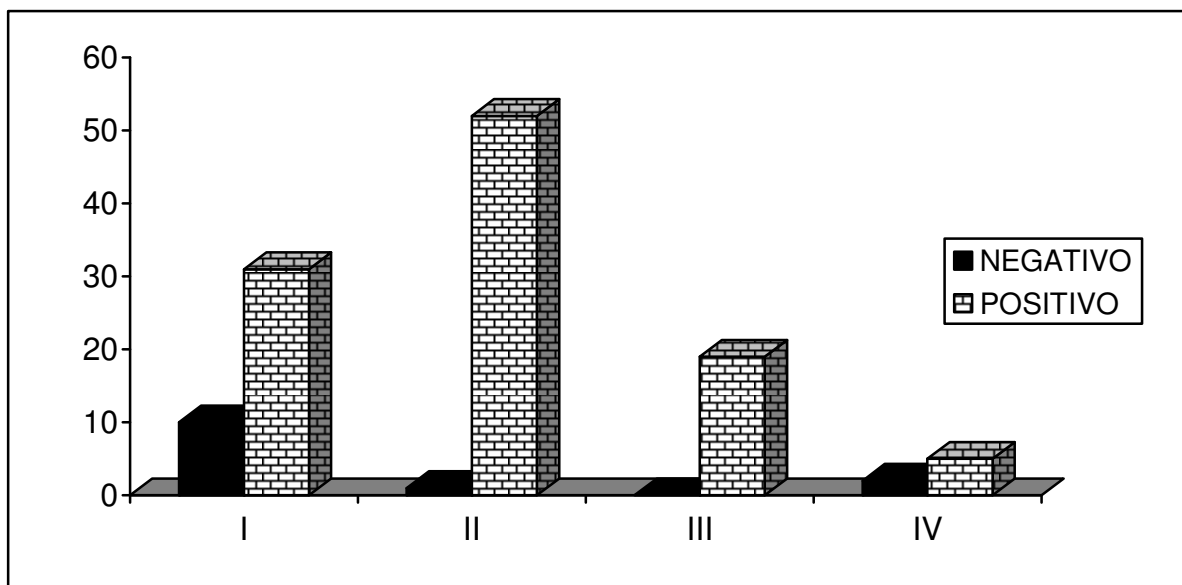


Gráfico 14 - Distribuição quanto à relação do p53 e estadio.

4.27 Associação entre p53 e histologia

A distribuição de freqüências das pacientes do p53 com o grau de diferenciação histológica do tumor encontra-se representada na tabela 27.

Tabela 27 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas das pacientes segundo p53 e a diferenciação histológica.

DIFERENCIAÇÃO HISTOLÓGICA	p53		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
Bem Diferenciado	28 (23,3%)	2 (1,7%)	30
Moderadamente Diferenciado	52 (43,3%)	7 (5,8%)	59
Pouco Diferenciado	27 (22,5%)	4 (3,3%)	31
TOTAL	107	13	120

p=0,799 pelo teste exato de Fisher. Não houve associação entre p53 e diferenciação histológica do tumor.

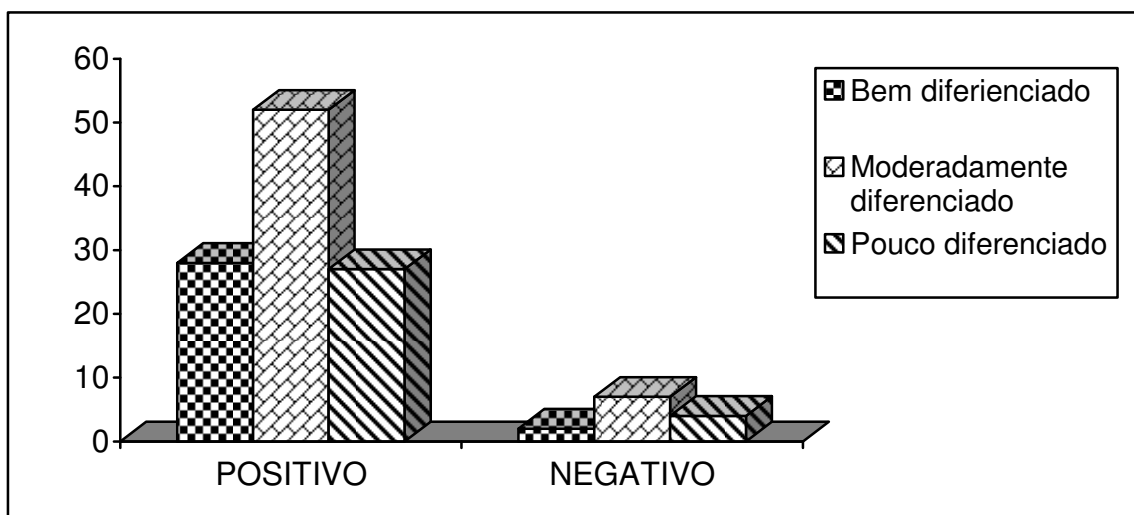


Gráfico 15 - Distribuição quanto à associação do p53 e grau histológico.

5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

5.1 Associação p53 e idade

A análise dos dados encontrados quanto à expressão positiva do p53 nas pacientes com câncer epidermóide em relação a idade, nos mostrou que 89% das pacientes, com idade menor ou igual a 69 anos apresentou positividade na expressão do p53. No grupo de pacientes com idade acima de 70 anos, 5% a apresentaram positiva. Não houve associação significativa, do ponto de vista estatístico, entre p53 e idade. A faixa etária em que a expressão do p53 foi mais freqüente foi a de 40 a 49 anos.

5.2 Associação p53 e etnia

A expressão do p53 foi positiva em 71,7% das mulheres brancas; 10,8% das mulatas e 6,7% das negras, a análise estatística demonstrou que não houve associação estatística entre p53 e etnia.

5.3 Associação p53 e tabagismo

Na análise de mulheres tabagistas e a expressão do p 53, observou-se esta expressão foi positiva em 36,7% das mulheres tabagistas e 52,5% não tabagistas. Não houve associação estatística significativa entre p53 e o uso do tabaco.

5.4 Associação p53 e paridade

A análise dos dados mostrou que o p53 foi positivo em 56,7% das múltíparas, seguido das secundíparas em 19,2%, tercíparas em 9,2%, 4,2% em primíparas e 0% em nulíparas. Demonstrou-se neste estudo não haver associação estatística significativa entre expressão positiva do p53 e paridade.

5.5 Associação entre p53 e idade da coitarca

A faixa etária mais freqüente da coitarca onde o p53 teve expressão positiva foi entre 15 a 19 anos. Nesse estudo, houve associação estatística significativa entre p53 e idade da coitarca.

5.6 Associação p53 e seguimento

O maior tempo de seguimento em pacientes com expressão p53 positivas foi de 1 a 5 anos; correspondendo a 43,3% das pacientes. Não observamos assim associação estatística significativa entre tempo de seguimento e positividade do p53.

5.7 Associação p53 e uso de anticoncepcional oral

Em pacientes usuárias de anticoncepcional oral, a expressão do p53 foi positivo em 53,3% das mulheres que não utilizavam anticoncepcional e 35,8% das

mulheres que utilizavam o método. Não houve associação estatística significativa entre p53 e uso de anticoncepcional oral.

5.8 Associação p53 e estadio

O percentual de pacientes em estadio I, II, III e IV, cujos tumores exibiam positividade do p53 foram 25,8%, 43,3%, 15,8% e 4,2% respectivamente e essa diferença foi estatisticamente significativa, sendo maior no estadio II.

5.9 Associação p53 e a diferenciação histológica

O percentual das pacientes com tumores com diferenciação histológica em bem diferenciado, moderadamente e pouco diferenciados, com expressão positiva do p53 foi respectivamente 23,3%; 43,3% e 22,5%. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa.

A necessidade de compreendermos melhor a etiopatogenia do câncer de colo uterino e os seus fatores clínicos e prognósticos, tem levado a um crescente número de pesquisas na biologia molecular, tanto para orientar tratamento adequado assim como para entender sua evolução.

Existem vários fatores prognósticos, alguns com valores já estabelecidos e seguros para serem utilizados na rotina clínica. Outros, entretanto, ainda constituem motivo de controvérsias e estudos. Nos últimos anos têm-se verificado crescente interesse em marcadores moleculares, mas ainda não se definiu, de forma clara, a sua utilidade na prática clínica. A superexpressão da proteína p53 em câncer de colo

uterino neste estudo foi encontrada numa freqüência de 15 a 50,0%^{6,10}, de acordo com a maioria dos pesquisadores. No presente estudo, o valor encontrado foi 89,2%. Estas discrepâncias talvez possam ser explicadas pelo uso de anticorpos variados, diferentes critérios leitura, particularidades da técnica e heterogeneidade da população estudada e ao fato de ter sido considerados os casos possivelmente HPV positivo.

Neste trabalho, utilizamos o anticorpo monoclonal específico e interpretamos a expressão da proteína p53 quando mais que 10,0% das células neoplásicas apresentaram núcleos corados, critérios que estão em concordância com parte dos autores. Como já exposto, a p53 age como um efetivo supressor de tumor em células.

A inativação da p53 está associada com o crescimento descontrolado das células e desenvolvimento do câncer.

6 DISCUSSÃO

A detecção de anormalidades do p53 pode ter implicações diagnósticas, prognósticas e terapêuticas.

Existe um sinergismo dos fatores de risco ditos como clássicos para câncer cervical com a perda da função do gene supressor de tumor, p53.

A maior incidência de câncer cervical é encontrada no grupo de mulheres com idade média de 52,2 anos, e a distribuição de casos é bimodal, com picos em 35-39 anos e 60 – 64 anos.⁽³²⁾

Em nosso estudo encontramos a média de idade de 46,5 anos, mostrando uma idade mais precoce de diagnóstico da neoplasia. O p53 esteve positivo mais frequentemente na faixa etária de 40 a 50 anos, porém sem correlação estatística significativa.

Várias estatísticas mostram maior número de casos de câncer cervical uterino nas populações negras e latino-americanas que vivem no território norte-americano.⁽¹⁴⁾ Nosso estudo mostrou uma maior incidência em pacientes brancas (82,5%) em relação as mulatas (10,8%) e à negra (8,0%), talvez explicada pela realidade sócio-econômica diferente nestes continentes. Não houve diferença estatística significativa de positividade do p53 em relação à cor.

A paciente típica com câncer cervical é a mulher múltipara.⁽¹⁰⁾ Como relatado na literatura, a multiparidade está associada com câncer de colo uterino, o que foi confirmado no nosso estudo sendo 77,0% a frequência de câncer em múltiparas (acima de 3 filhos). Em relação à positividade da expressão do p53, não encontramos associação estatisticamente significativa.

Há evidências indiretas de que os contraceptivos hormonais promovem infecção pelo HPV e conseqüentemente câncer cervical. Dois estudos de caso-controle da relação entre largo uso de anticoncepcional oral e câncer cervical, mostraram aumento de 2,0% no risco da neoplasia.⁽⁵⁾ Do ponto de vista estatístico, não obtivemos correlação entre p53 e uso de anticoncepcional oral.

Quanto ao tabagismo, a nicotina tem sido encontrada no muco cervical de mulheres fumantes em concentrações mais altas que no plasma. Esses metabólitos não são carcinogênicos por si próprios, mas diminuem os mecanismos de defesa imune locais tais como as células de Langerhans. Estudos de caso-controle demonstraram aumento aproximado de 2,0% no risco de câncer cervical por fumantes.⁽⁸⁾ No nosso estudo não houve correlação significativa quanto a presença do p53 positivo e tabagismo.

O sistema de estadiamento proposto pela FIGO espelha nitidamente a evolução da doença e apresenta talvez o melhor fator prognóstico para o câncer cervical.⁽¹⁴⁾ Nosso estudo mostrou o percentual de 43,3% das mulheres em estágio II da doença e podemos observar correlações estatisticamente significativas entre p53 positivo e estadiamento.

Além do estadiamento, outros fatores são apontados como importantes na avaliação prognóstica. A graduação histológica tem significação controversa no prognóstico.

A graduação histológica dos carcinomas epidermóides é baseado no sistema de Broders que leva em conta a quantidade de ceratinização, pleomorfismo e atividade mitótica e permite que sejam classificados em: bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados.

Shidu e Cols mostraram maior freqüência de metástases em linfonodos pélvicos e órbita em pacientes com tumores bem diferenciados, em comparação com os poucos diferenciados. Por outro lado, Chung e Cols, mostraram que o índice de metástase em linfonodos pélvicos aumenta com a diferenciação. Yopkin e Cols, estudando 345 pacientes com carcinoma cervical estadios IB, encontraram sobrevida de 5 anos em 95,0 % nos tumores bem diferenciados e 82,0% no pouco diferenciado.⁽¹⁴⁾

Quanto á histologia, neste estudo, e no mesmo estudo houve predomínio do tipo moderadamente diferenciado (49,2%), porém não foi possível o estudo de sobrevida porque muitas pacientes perderam o seguimento. De nosso estudo só foi possível concluir que as pacientes em estágios de câncer mais avançados tiveram um tempo de seguimento menor.

Não houve correlação estatística significativa entre p53 positivo e grau de diferenciação do tumor.

Após o diagnóstico de câncer cervical invasivo ser estabelecido, a questão é como melhor tratar a paciente. As medidas terapêuticas específicas são geralmente dirigidas pela idade e estado geral da paciente, extensão do câncer e pela presença e natureza de qualquer anormalidade que complique.⁽¹⁰⁾

A radioterapia exclusiva no mesmo estudo, foi o tratamento mais utilizada (52,5%) devido ao diagnóstico da doença em estágios mais avançados, seguindo pela cirurgia de Wertheim Meigs (24,2%).

Não correlacionamos tais dados a presença do p53 positivo por não acharmos a correlação de importância.

A expressão alterada do p53, em nosso estudo, foi demonstrada em 89,2%

das pacientes, utilizando o método de imunohistoquímica que segundo a literatura detecta o p53 mutante devido a sua meia vida mais prolongada.

O p53 foi negativo em 10,8% dos casos segundo a literatura da imunohistoquímica pode indicar estado de p53 tipo selvagem (ou seja, p53 com função normal) ou p53 inativado resultando da ação de oncogenes virais.

Muitos estudos examinam o valor prognóstico de mutações do p53 em uma variedade de câncer. Esses dados concluem que pacientes com tumores com mutações do p53 são piores do que aqueles pacientes sem mutações do p53, em termos de sobrevida total livre da doença.

Escrevemos esta discussão, reconhecendo que a casuística foi pequena. Mesmo assim nos possibilitou.

- a) aumentar nossos conhecimentos a respeito de alguns fatos prognósticos do câncer de colo uterino.
- b) Desenvolver nosso interesse pela investigação anátomo clínica relacionada à patologia do colo do útero.

7 CONCLUSÕES

Apesar do pequeno número de pacientes estudadas, este trabalho permitiu-nos as seguintes conclusões:

- 1- A expressão positiva do p53 está associada com o mau prognóstico das pacientes com câncer invasivo de colo útero.
- 2- Os aspectos epidemiológicos, o estadiamento, e as formas de tratamento não se evidenciaram como fatores prognósticos quando relacionados com a expressão do p53.

REFERÊNCIAS

1. Akasi, M, Koeffler, HP. Li Fraumeni Syndrome and Role of the p53 Tumor Suppressor Gene in Cancer Susceptibility, **Clinical Obstetrics and Gynecology**, (41):172-199,1998.
2. Alberts, B, Johnson, A, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K, Walter P. **Molecular Biology of the Cell**. 4. ed. New York: Garland Science; 2002.
3. Arends, MJ, Buckley, CH, Wells, MA. etiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia, **J. Clin Pathol**, (51):96-103,1998.
4. Berchuck, A, Kohler, MF, Marks, JR, Wislman, R, Boyd, J, Bast Jr., RC, The p53 tumor suppressor gene frequently is altered in gynecologic cancers. **American J. Obstet Gynecol**, (170):246-252, 1994.
5. Bornstein, J, Rahat, MA, Abramovici, A Etiology of Cervical Cancer; Current concepts, **Obstetrical and Gynecological Survey**, (50):146-154, 1995.
6. Brasil, MS. **Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://inca.gov.br>>. Acesso em: 13 out. 2008.
7. Chang, F, Syrjanen, S, Syrjanen, K. Implications of the p53 Tumor Suppressor Gene in Clinical Oncology. **Journal Clinical Oncology**, (13):1009-1022, 1995.
8. Chiarugi, V, Ruggiero M. Role of the cancer "master genes" p53, BCL 2 and C, **Myc on the apoptotic process**, Tumori, (82):205-209, 1996.
9. Diamandw, EP. Clinical applications of the p53 tumor suppressor gene. **Clinica Chinica Acta**, (237):79 -90, 1995.
10. Disaia, PJ, Creasman, WT. Clinical Gynecologic Oncology fifth ed., **Mosby**, 51-106, 1997.
11. Franco, EL, Schlecht, NF, FS, Saslow, D. The Epidemiology of Cervical Cancer. **The Cancer Journal**, 9(5): Sept./Oct. 2003.
12. Fisher et al., 1993.
13. Greenblat, MS, Bennett, WP, Hollstein, M, Harris, CC. Mutation in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. **Cancer Research**, (54):4855-4878, 1994.
14. Halse, HW. Tratado de Ginecologia, Segunda ed., **Roca** (2):1807-1854, 1995.
15. Harris, CC. p-53 Tumor Suppressor Gene: At The Crossroads of Molecular Carcinogenesis, Molecular Epidemiology and Cancer Risk Assessment. **Environmental Health Persp**, (104):435-439, 1996.

16. Harris, CC. Structure and Functions of the p-53 tumor suppressor gene: Clues for Rational Cancer Therapeutic Strategies. **J. National cancer Inst**, (88):1442-1445, 1996.
17. Hsu, SM, Raine L, Fanger H. Use of avidina-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and Ulabeled (PAP) procedures. **J Histochem Cytochem**, 19814(29): 577-80.
18. Inca. Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas, recomendações para profissionais de saúde, 2. Ed. R. de Janeiro: Inca, 2006.
19. IshikawaH, MN, Sakuari, H, MaebayashiK, NH. The effects of p53 status and papillomavirus infection on the clinical outcome of patients with stage IIIb cervical carcinoma trated with radiation therapy alone. **Cancer**, (91):80-9, 2001.
20. Klumb, CE, Cavalcanti Jr, GB. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína p53 nas neoplasias linfonodais. *Rer. Bras. Hematol. Hemoter*, 24 (2): 111-125, 2002.
21. Lee, JM, Bernstein, A. Apoptosis,cancer and the p-53 tumor suppressor gene. **Cancer and Metastasis Reviensis**, (14):149-161, 1995.
22. Lowe, SW. Cancer Therapy and p 53. **Current Opnion in Oncology**, (7):547-553, 1995.
23. Lu, FA. Phenotypic features with p53 alterations related to human pappilomavirus and prognostic evaluation in cervical cancer. **Int J Gynecol Cancer**, (16):708-717, 2006.
24. Matthews et al., 1996.
25. Mellona, M, Rinaldi, C, Massoni, I, Petroni, M, Veschi, V, Talora, C, Truffa, S, Stabille, H, Frati, L, Screpanti, I, Gulino, A, Giannini, G. Human Papilloma Vírus-Dependent HMGA1 Expression Is a Relevant Step in Cervical Carcinogenesis. **Neoplasia**, (10):773-781, 2008.
26. Min-Min, H, Min-rong, X, Ze-yi, C, Kai-xuan, Y, Zhi-lin, S. Analysis of p53 codon 72 polymorphism and its association with human papillomavirus 16 and 18 E6 in Chinese cervical lesions. **Int J Gynecol Cancer**, (16):2004-2008, 2006.
27. Munger, K, Hoewley, PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus Res**, (89):213-28, 2002.
28. Nakamura, S, Gomyo, Y, Ro JA. C- terminus of p53 is required for G(2) arrest. **Oncogene**, (27):2102-7, 2002.
29. Pinho, MSL. **Biologia molecular do câncer**: fundamentos p/ a prática médica. 1st. ed. Rio de Janeiro, 2005. p. 83-4.
30. Piver, MS, Rutledge, FN, Smith, PJ. Five classes of extended hysterectomy of

- women with cervical cancer. **Obstet Gynecol**, (44):265-67, 1974.
31. Rocha, AD et al. Expressão imunohistoquímica e valor prognóstico da proteína e valor prognóstico da proteína p53 no carcinoma de ves. biliar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** 40(6):403-10, 2004.
 32. Semenza, JC, Weasel, LH. Molecular Epidemiology and Environmental Health: The Potential of Tumor Suppressor Gene p53 as a Biomarker. **Environmental Health Perspect**, (105):155-163, 1997.
 33. Silva Filho, AL da. **Expressão das Proteínas p53, Ki-67 e CD31 no tumor e nas margens vaginais após histerectomia radical em pacientes com carcinoma invasor do colo uterino**. 2004. p.96 Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
 34. Simon, DAS. biologia molecular aplicada ao diagnóstico e tratamento do câncer. **Dialogo científico**, 1(3):18-22, 2004.
 35. Stewart, BW, Kleihues, P (Ed.). **World cancer report**. Lyon: IARC Press, 2003.
 36. Swan, DC, Vernon, SD, Icenogle, JP. **Cellular Proteins Involved in papillomavirus – induced transformation Arch Viro**, (138):105-115, 1994.
 37. Tobias, ES, Black, DM. The molecular biology of cancer; In: RIMON, DL, CONNOR, JM. **Principles of Medical Genetics**. 4th ed. London: Hancouvert Publishers Limited, 2002, p. 533-7.
 38. Vousden, K. Interactions of human papillomavirus transforming proteins of tumor suppressor genes. **The FASEB Journal**, (7):872-879, 1993.
 39. Waggoner, SE. O cancer cervical. **The Lancet**, 361:2217-25, 2003.
 40. Walsh, CB, Kay, EW, Leader, MB. The Pathology of Cervical Cancer Clinical Obstetrics and Gynecology, (38):653-661, 1995.
 41. Wang, XW, Harris, CC. p53 tumor-suppressor gene: Clues to molecular carcinogenesis. **J cell Physiol**, 173:247-255, 1997.
 42. Wang, TH, Wang, HS. p53, Apoptosis and Human Cancers, **J. Formos Med. Assoc.**, (95):509-522, 1996.
 43. Weller, M. Predicting response to cancer chemotherapy: The role of p53. **Cell Tissue Res**, (292):435-445, 1998.

ANEXOS

Anexo A - Tabela Papanicolaou. Comparação entre Sistema Bethesda, Papanicolaou, Sistema NIC, e Displasia

CLASSES Papanicolaou	DESCRIÇÃO	GRADAÇÃO NIC ²	SISTEMA BETHESDA ¹
I	Normal	Normal	Normal
II	Atipia reativa / inflamatória	Atipia	Normal
II / III	Atipia suspeita	Atipia	ASCUS
II / III	Atipia com HPV	Atipia, atipia condilomatosa ou coilocitótica	SIL de baixo grau (LSIL)
III	Displasia leve	NIC I	SIL de baixo grau (LSIL)
III	Displasia moderada	NIC II	SIL de alto grau (HSIL)
III	Displasia acentuada	NIC III	SIL de alto grau (HSIL)
IV	Carcinoma in situ	NIC III	SIL de alto grau (HSIL)
V	Câncer invasivo	Câncer invasivo	Câncer invasivo
¹ No sistema Bethesda, as lesões cervicais escamosas são divididas em 4 categorias: Atipia em Células Escamosas de Significado Indeterminado (ASCUS)			
Lesão Intraepitelial (SIL) de Baixo Grau (LSIL)			
Lesão Intraepitelial (SIL) de Alto Grau (HSIL)			
Carcinoma de Células Escamosas			
¹ No sistema Bethesda, as lesões glandulares são divididas em 6 categorias: Células endometriais, citologicamente benignas, em mulheres pós menopausa			
Atipia em Células Glandulares de Significado Indeterminado (AGUS)			
Adenocarcinoma Endocervical			
Adenocarcinoma Endometrial			
Adenocarcinoma Extrauterino			
Adenocarcinoma não especificado			

²No sistema Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) a classificação é dada pela espessura proporcional do epitélio cervical com alterações citológicas:

NIC I Crescimento anormal restrito ao terço inferior do epitélio (Displasia Leve)
NIC II Lesão envolvendo entre 1/3 a 2/3 do epitélio a partir da base (Displasia Moderada)
NIC III Lesão envolvendo mais de 2/3 do epitélio (Displasia Acentuada e Carcinoma In Situ)

Anexo B - Estadiamento de câncer cervical, FIGO, 1994.

Estagio	Descrição
Estagio O	Carcinoma-in-situ, carcinoma intraepitelial
Estagio I	Carcinoma invasor estritamente confinado a cérvix
Estagio IA	Carcinoma invasor - Invasão estromal de no máximo 5 mm de profundidade, e até 7 mm de extensão, identificado microscopicamente (todas as lesões grosseiras, mesmo com invasão superficial, devem ser colocadas no estagio IB)
Estagio IA1	Invasão estromal $\leq 3,0$ mm em profundidade e até 7,0 mm de extensão
Estagio IA2	Invasão medida do estroma entre 3,0 e 5,0 mm em profundidade e não mais extensa do que 7,0 mm
Estagio IB	Lesões pré-clínicas maiores do que estagio IA ou lesões clínicas confinadas a cérvix
Estagio IB1	Lesões clínicas de 4,0 cm ou menos em tamanho
Estagio IB2	Lesões clínicas maiores do que 4,0 cm em tamanho
Estagio II	Carcinoma extendendo além da cérvix mas não a parede lateral pélvica; carcinoma envolve a vagina mas não a terça parte inferior
Estagio IIA	Envolvimento dos dois terços superiores da vagina, sem envolvimento parametrial
Estagio IIB	Envolvimento parametrial sem envolvimento da parede pélvica
Estagio III	Envolvimento do terço inferior da vagina ou infiltração do paramétrio até a parede pélvica. Todos os casos com hidronefrose ou rim não-funcionante devem ser incluídos, a menos que haja outra causa para tal comprometimento.
Estagio IIIA	Envolvimento da terça parte inferior da vagina; sem extensão a parede pélvica
Estagio IIIB	Extensão a parede lateral pélvica e/ou hidronefrose ou não funcionamento renal
Estagio IV	Extensão além do trato genital clinicamente a mucosa da bexiga ou do reto.
Estagio IVA	Avanço de crescimento em órgãos adjacentes, bexiga, reto ou ambos
Estagio IVB	Metástase à distância