

SYLVIA MICHELINA FERNANDES BRENNA

**EXPRESSÃO PROTÉICA DE P53 E C-MYC
COMO MARCADORES NO PROGNÓSTICO
DO CARCINOMA DE COLO UTERINO**

Tese de Doutorado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do
Título de Doutor em Tocoginecologia

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ CARLOS ZEFERINO
CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a GLAUCE APARECIDA PINTO

UNICAMP
2000

UNIDADE 3e
N.º CHAMADA:
TIUNICAMP
B75e
V. _____ Ex. _____
TOMBO BC/ 42215
PROC. 16.278100
C D
PREÇO R\$99,00
DATA 29/09/00
N.º CPD _____

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CM-00144800-3

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

B75e Brenna, Sylvania Michelina Fernandes
Expressão proteica de p53 e c-myc como marcadores
no prognóstico do carcinoma de colo uterino / Sylvania
Michelina Fernandes Brenna. Campinas, S.P.: [s.n.], 2000.

Orientadores: Luiz Carlos Zeferino, Glauce Aparecida Pinto
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Colo uterino - Câncer. I. Luiz Carlos Zeferino. II.
Glauce Aparecida Pinto. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno: SYLVIA MICHELINA FERNANDES BRENNNA

Orientador: Prof. Dr. LUIZ CARLOS ZEFERINO

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. GLAUCE APARECIDA PINTO

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 30/06/00

Esforço máximo

*Ninguém se eleva,
sem esforço máximo da vontade,
dos campos do hábito
para as regiões iluminadas da experiência.*

*Entretanto, ninguém atinge
as múltiplas regiões da experiência
sem passaportes adquiridos
nas agências da dor do aprendizado.*

Emmanuel
(Pe. Manoel da Nóbrega)

Dedico esta tese...

*...ao meu esposo Laércio Brenna,
pelo amor e compreensão e por completar a minha vida.*

*...à minha mãe Maria Carmela Fernandes,
pela minha formação em Medicina e por sua coragem em ser mãe e pai.*

*...aos meus mestres,
Prof. Dr. Aníbal Faúndes e Prof. Dr. José Guilherme Ceccatti,
pelo carinho e exemplo como seres humanos, professores e pesquisadores.*

*...aos amigos e diretores do HMLMB,
Prof. Dr. Corintio Mariani Neto e Dr. Valdir Tadini,
pelo apoio incondicional e pelo exemplo de persistência e luta.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino e Profa. Dra. Glauce Aparecida Pinto, pela orientação deste trabalho.

Aos Dr. Temistocles Pie de Lima, diretor de Divisão Médica do HMLMB e à Dra. Maria Nieves Monterroso, diretora técnica da Área de Ginecologia, pela compreensão durante a minha ausência.

Aos amigos Dra. Márcia M. A. Aquino Rosalem e Dr. Marcelo Giacobbe, por compartilharem com paciência as dificuldades vividas durante a pós-graduação, pelo apoio e companheirismo.

Aos amigos, Dr. Maurício de Sena Martins, Profa. Dra. Cecília Rotelli Martins e Dra. Ana Cláudia Guedes, pelo apoio e incentivo.

À Dra. Sheila A. Coelho Siqueira, pela valiosa ajuda na leitura das lâminas.

Ao Prof. Dr. Aarão M. Pinto Neto, pelo carinho e amizade.

À Diretoria Executiva do CAISM, ao Prof. Dr. João Luiz Pinto e Silva, diretor do Departamento de Tocoginecologia, ao Prof. Dr. Luis Guillermo Bahamondes,

coordenador da Pós-graduação em Tocoginecologia e à Profa. Dra. Kazue Panetta, chefe da Área de Oncologia.

À Márcia R. Siqueira, Margarete Amado S. Donadon e ao Carlos Carducci, pelo apoio, dedicação e amizade.

À Nilvana Gomes F. Carmo e à Enfermeira Angela Maria Morelato, pelo profissionalismo e dedicação.

À Assessoria Técnica do CAISM, pelo profissionalismo na revisão final deste trabalho e à Sueli Chaves, Fernanda Atibaia, Maria do Rosário G. R. Zullo e William A. de Oliveira pelo apoio pessoal.

Ao Edson Z. Martinez, pela competência e qualidade da análise estatística, pela amizade e dedicação.

Ao Departamento de Patologia da FCM, ao Prof. Dr. José Vassalo, por sua participação neste estudo e à Profa. Dra. Liliana A. L. Andrade, pela dedicação e valioso auxílio na leitura das lâminas.

Ao Laboratório de Patologia Experimental, pelo valioso auxílio na elaboração deste trabalho e à Marisa de Almeida Matsura, pela dedicação.

Ao Laboratório de Análise Clínicas LGA, ao Instituto de Patologia de Campinas, ao Laboratório de Anatomia Patológica Dr. José Ribeiro Menezes Netto Ltda, ao Laboratório LABAP, ao Laboratório de Anatomia Patológica e Citologia de Limeira S/C Ltda, ao Histolab – Anatomia Patológica S/C Ltda, ao Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia da Santa Casa de Rio Claro, ao Instituto de Anatomia Patológica, ao Instituto de Patologia e Citologia Dr. Victório Valeri Ltda, ao Laboratório de Anatomia Patológica e Citologia Diagnóstica Dr. Fernando Tito Mota S/C Ltda – Mogi-Guaçu, ao Serviço de Anatomia Patológica e Citologia Dr. Laert Noel

Ravanini e ao Laboratório de Anatomia Patológica Mattosinho, por cederem alguns blocos de parafina para este estudo.

Ao Serviço de Arquivo Médico do CAISM, pela atenção e colaboração.

Ao Serviço Social do CAISM, pela valiosa colaboração na obtenção de informações sobre as mulheres que participaram deste estudo.

Às secretárias e assistentes de direção do HMLMB, pelo apoio e “torcida”, à Rosana Negrizoli e Rosângela P. Olivieri, pela paciência e auxílio nos momentos mais difíceis.

Às enfermeiras do ambulatório e da enfermaria de Ginecologia do HMLMB, pelo apoio e profissionalismo, à auxiliar de enfermagem Solange Aparecida A. Monteiro pela amizade e à Enfermeira Maria Tereza Carcelen, pela paciência e exemplo de dedicação.

Ao Serviço de Arquivo Médico do HMLMB, pela atenção e colaboração.

À Dra. Renata Albano, ex- residente do HMLMB e ao Dr. Robenilson A. Souza, residente da FCM, pela colaboração na coleta de dados.

Ao Sr. José Facchini pela revisão de português e à Cristiani Brandi pela revisão de inglês.

Às amigas do grupo Pasteur do GE Bezerra de Menezes, pelo apoio incondicional, carinho e amizade.

Às mulheres, cujos fragmentos de tecido foram utilizados neste estudo, meu respeito e gratidão.

Este estudo foi financiado pela FAPESP
(processo 98/10174-4)

Sumário

Siglas

Glossário

Resumo

1. Introdução	1
1.1. Genes supressores de tumor	3
1.2. Oncogenes	5
1.3. Carcinoma de colo uterino	8
2. Objetivos	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. Casuística e Métodos	16
3.1. Desenho do estudo	16
3.2. Tamanho amostral	16
3.3. Seleção dos sujeitos	17
3.4. Variáveis e conceitos	19
3.5. Coleta de dados	21
3.6. Processamento laboratorial	22
3.7. Análise dos dados	29
3.8. Aspectos éticos	31
4. Resultados	32
4.1. Características da amostra	32
4.2. Tendências	34
4.3. Sobrevida	35
4.4. Regressão de riscos proporcionais	49
5. Discussão	51
5.1. Expressão protéica de p53	53
5.2. Expressão protéica de c-myc	57
5.3. Faixa etária e tempo de atividade sexual	60
5.4. Considerações gerais	61
5.5. Considerações finais	63
6. Conclusões	65
7. Summary	66
8. Referências Bibliográficas	68
9. Bibliografias de Normatizações	78
10. Anexos	79

HMLMB	Hospital e Maternidade Leonor Mendes de Barros
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CEC	Carcinoma Espino-Celular
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
IARC	Agência Internacional de Pesquisa do Câncer
WHO	World Health Organization
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
SIL	Lesão Intraepitelial Escamosa
HPV	Papiloma Vírus Humano
E e L	Antígenos virais precoce ou <i>early</i> e tardio ou <i>late</i>
SR	Taxa de Sobrevivência ou <i>Survival Rate</i>
SRR	Razão da Taxa de Sobrevivência ou <i>Survival Rate Ratio</i>
HR	Razão de Risco ou <i>Hazard Ratio</i>
IC	Intervalo de Confiança

CCDPT	Controle Clínico da Doença Pós-Tratamento
CDK	Ciclina Dependente da Kinase
PCNA	Antígeno Nuclear de Célula em Proliferação
HE	Hematoxilina Eosina
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
HLH	<i>Helix-loop-Helix</i>
LZ	<i>Leucine Zipper</i>

Glossário

- p53** gene supressor de tumor que codifica proteína de 53 kilodaltons (kd)
- Rb** gene supressor de tumor que codifica proteína de 110 kd. Foi descrito inicialmente no retinoblastoma, em crianças.
- p21^{waf1cip1}** gene inibidor de CDK que codifica proteína de 21 kd
- p16** gene inibidor de CDK que codifica proteína de 16 kd
- p27** gene inibidor de CDK que codifica proteína de 27 kd
- c-myc** protooncogene ou oncogene, que codifica proteína de 62 kd. Foi descrito inicialmente na leucemia mielóide.
- bax** proto ou oncogene, que codifica proteína de 19 kd
- bcl-2** proto ou oncogene, que codifica proteína de 26 kd
- Genótipo** características do indivíduo dada pelos genes
- Fenótipo** características do indivíduo que se pode ver ou mensurar como consequência de mutações dos genes
- Alelo** forma alternativa do mesmo gene. Todos os genes existem em duas cópias e cada cópia é um alelo
- Codons** seqüência de três nucleotídeos

Nucleotídeos	unidade do DNA e do RNA, constituído por açúcar, fosfato e base nitrogenada
Bases	compõem os ácidos nucleicos e são as purinas (adenina e guanina) e as pirimidinas (timina e citosina)
Exons	seqüências de bases que fazem parte da mensagem definitiva do gene
Genoma	totalidade das mensagens codificadas numa molécula de DNA
Transcrição	processo que converte o código de DNA para o RNAm complementar
Translação	processo no qual aminoácidos específicos são incorporados na proteína, ditados pela seqüência de RNAm
Translocação	recombinação de segmentos do código genético não homólogos
Amplificação	presença de múltiplas cópias do gene na célula. Normalmente há somente duas cópias por célula somática
Deleção	deleção de parte ou todo o gene através da remoção das seqüências de DNA
Mutação	alteração no DNA
Expressão	transcrição ativa de um gene para a molécula de RNA, seguida de transdução do produto protéico
Heterozigose	duas diferentes formas do mesmo gene na célula. Os polimorfismo são responsáveis pelo <i>status</i> da heterozigose
Perda da heterozigose	perda de regiões específicas do DNA de uma cópia de um cromossomo
Polimorfismo	variação na exata seqüência de bases
Tipo selvagem	termo usado para descrever o gene normal ou o produto do gene. O gene que tem a seqüência de DNA alterada é referido como gene mutante e o seu produto como proteína mutante

Resumo

Alguns estudos analisaram a expressão protéica de p53 e c-myc como marcadores no prognóstico do carcinoma de colo uterino, mas a maioria foi realizada em países desenvolvidos, onde há programas de rastreamento eficientes, que podem selecionar estádios iniciais e formas agressivas da doença. O objetivo deste estudo foi analisar a associação destas proteínas com o prognóstico do carcinoma espino-celular invasivo de colo uterino (CEC). Foi de coorte, considerou poder de 80% e IC de 95%. Incluiu 220 mulheres diagnosticadas entre 1992 e 1994, nos estádios Ib-III, seguidas por cinco anos. Os blocos de parafina foram processados para imuno-histoquímica: p53 (Dako DO7) e c-myc (Santa Cruz Biotechnology MX 9E10). Para a análise estatística utilizou-se: teste de Cochran-Armitage, método de Kaplan-Meier, testes de Wilcoxon ou log-rank e modelo de risco proporcionais de Cox. A idade das mulheres variou de 25-80 anos (média 53,4) e o CEC foi diagnosticado em 22%, 28% e 50%, nos estádios I, II e III respectivamente. A freqüência das proteínas foi 35% para p53 e 40% para c-myc. Houve tendência linear inversa

entre a faixa etária e a proteína p53 ($p=0,03$) e entre o tempo de atividade sexual e a proteína c-myc ($p=0,03$). As mulheres no estágio II e proteína p53 tiveram menor sobrevida livre de doença ($p<0,01$) e risco de recidiva 2,6 (IC 1,1-6,2) vezes maior, nos 12 primeiros meses ($p=0,02$). As mulheres com controle clínico da doença pós-tratamento e proteína c-myc tiveram menor sobrevida livre de doença ($p<0,01$) e risco de recidiva 2,1 (IC 1,1-3,9) vezes maior, nos 12 primeiros meses ($p=0,02$). A proteína p53 associa-se ao mau prognóstico apenas no estágio II e a proteína c-myc associa-se apenas nas mulheres com controle clínico da doença pós-tratamento.

1. Introdução

Os cânceres ocorrem quando alterações genéticas interferem nos mecanismos normais de controle do crescimento celular. Estas alterações podem ser herdadas ou adquiridas e por isso entende-se que a carcinogênese é um processo de múltiplos estágios, a nível de genótipo e fenótipo, que envolve alterações cumulativas.

Desde a publicação, da estrutura do ácido desoxirribonucléico (DNA), por WATSON & CRICK¹ (1953), houve grande progresso na compreensão das relações entre este e a função celular. A fita de DNA é uma estrutura em dupla hélice, na qual o código genético é representado por seqüências de nucleotídeos aos pares: adenina com timina e citosina com guanina. A molécula de DNA transmite a informação genética através de sua capacidade de duplicação. Para que isto ocorra, cada célula com a fita de DNA, deve dividir-se durante o ciclo celular (GOMPEL & KOSS, 1997).

¹ WATSON J.D. & CRICK, F.H.C., 1953 apud GOMPEL C. & KOSS L.G. - Princípios de biologia molecular - As funções celulares. In: GOMPEL C. & KOSS L.G. - **Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas**. São Paulo: Manole Ltda., 1997. p.13-21.

O ciclo celular parece iniciar-se quando fatores de crescimento ligam-se a receptores de membrana, os quais ativam proteínas transdutoras de sinais. Uma vez que estes sinais chegam ao núcleo, ativam-se os fatores de regulação nuclear, e estes iniciam a transcrição do DNA, ultimando a divisão celular. Possivelmente o ciclo se desenvolve em quatro etapas, denominadas de fases: G1 (gap ou lacuna), S (síntese), G2 e M (mitose). Na fase G1, com aproximadamente oito horas, a célula acumula no citoplasma os materiais necessários para o desdobramento do DNA. Após há uma pausa, denominada ponto R ou primeira parada, no qual haverá uma checagem da fita de DNA, antes da progressão do ciclo. Se houver alguma anormalidade na informação genética, a mesma deverá ser reparada durante esta parada, caso contrário, a célula não poderá prosseguir. Na fase S, com duração aproximada de oito horas, ocorre a replicação do DNA e na fase G2, com quatro horas, há o armazenamento dos materiais necessários para a mitose. Por último ocorre a fase M, com duração de uma e meia a duas horas, onde há a duplicação da célula (CORTNER & WOUDE, 1997; GOMPEL & KOSS, 1997).

A progressão do ciclo celular é controlada por um grupo de proteínas reguladoras denominadas kinases dependentes da ciclina (CDK). Estas são enzimas, que ligam-se a outras proteínas ativadoras denominadas de ciclinas e ambas agem através de reação de fosforilação em outros substratos, os quais inibem ou ativam fases específicas do ciclo celular. Assim, para a célula entrar na fase G1, age a ciclina D ligada a CDK4 ou a CDK6; após o ponto R, ainda na fase G1, age a ciclina E ligada a CDK 2. Já na fase S age a ciclina A, na fase G2

as ciclinas A e B e na fase M a ciclina B, ligadas às CDK correspondentes (KASTAN, 1997; SINGER & MONAGHAN, 1999).

Uma vez ocorrida a divisão celular, cada célula contém informações específicas na fita de DNA, as quais são transcritas a nível nuclear para a fita de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm). Este leva as informações até o citoplasma, mais especificamente até os ribossomos, onde com o auxílio do RNA de transferência (RNAt) e do RNA de síntese (RNAs) ocorre a síntese de proteínas. Cada célula é programada para cumprir suas funções e terminar o seu ciclo de vida com a morte celular programada, denominada apoptose. A apoptose, na realidade, é um processo controlado geneticamente, que atua na remoção de células indesejáveis, cujo processo está envolvido tanto em funções fisiológicas quanto patológicas (CORTNER & WOUDE, 1997).

Os avanços da biologia molecular permitiram a identificação de genes que intervêm no crescimento celular, possibilitando o melhor conhecimento do processo da carcinogênese humana. Podemos citar duas classes de genes: os supressores de tumor e os oncogenes.

1.1. Genes supressores de tumor

São genes que codificam proteínas capazes de regular o crescimento celular, suprimindo o comportamento maligno das células. Quando mutados podem perder sua função por deleção de um dos alelos; o que é denominado de perda de heterozigose. São conhecidos cerca de dez destes genes, entre

eles o p53, que talvez seja o gene supressor mais estudado. As suas mutações já foram descritas em vários canceres humanos, incluindo: câncer de mama, colo uterino, colon, pulmão, fígado, próstata, bexiga e pele (GODWIN et al., 1997). O gene p53 é a defesa do organismo contra a formação de um câncer porque ele protege a informação genética das células, motivo pelo qual foi chamado de “guardião do genoma” por LANE (1992).

Este gene codifica proteína nuclear de 53 kilodaltons (kd), localiza-se no cromossomo 17p13.1, tem 393 aminoácidos, 11 exons e tem a função de controlar o ciclo celular. A expressão do p53 na forma selvagem ou *wild* se faz através de proteínas, que têm meia-vida curta, de seis a vinte minutos e, nesta condição é dificilmente detectada por método de imuno-histoquímica (IARC, 1998).

Quando existe alguma danificação do DNA, o gene p53 é ativado, parando o ciclo celular no ponto R, na fase G1, para permitir que o DNA recupere-se antes de prosseguir o ciclo. Assim, o gene p53, através de sua proteína envia sinal para outros genes chamados inibidores de CDK/ciclina, como o p16, p27 e p21^{waf1cip1} e há parada do ciclo celular. Se houver reparo do DNA, o p21 sinaliza para o complexo CDK/ciclina para prosseguir o ciclo. Em condições normais, se não houver restauração do DNA, o gene p53 sinaliza para outros genes reguladores, como bax, bcl-2 e c-myc e há indução da apoptose, eliminando a célula com a informação genética avariada. A ação conjunta dos genes c-myc, bax, bcl-2, resulta em maior ou menor propensão à morte celular programada (SINGER & MONAGHAN, 1999; SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 2000).

No entanto, sabe-se que as mutações do gene p53 podem ocorrer após dano ao DNA por fontes endógenas ou exógenas, tais como radiação ultravioleta, no caso do câncer de pele; por dieta com aflotoxina, no câncer de fígado; por fumo, no câncer de pulmão, esôfago e cabeça e pescoço (IARC, 1998). Estas mutações podem causar instabilidade no genoma e em consequência há mutações no gene p53. Neste caso, a proteína p53, codificada pelo gene mutado, passa a ter vida média de seis a oito horas, o que a torna detectável por método de imuno-histoquímica (CHO, 1998). A mutação do gene p53 também pode ser hereditária, como na Síndrome de Li-Fraumeni, na qual os membros da mesma família desenvolvem múltiplos tumores (SKILLING & SOOD, 1997).

1.2. Oncogenes

São derivados de protooncogenes, os quais são genes celulares que promovem o crescimento e diferenciação normal da célula. Estes genes quando estão mutados tornam-se hiperexpressos ou amplificados no número de cópias e ganham uma função paradoxal, funcionando como promotores da expansão clonal da célula tumoral, passando a ser denominados de oncogenes (SKILLING & SOOD, 1997). Nestas condições, as oncoproteínas, codificadas por estes genes, são responsáveis pela proliferação anormal das células, que uma vez desreguladas, superam a parada do ciclo celular no ponto R, onde seria feita a checagem do DNA. Assim, se houver dano ao genoma, não haverá tempo suficiente para sua reparação, tampouco haverá tempo para a célula danificada ser enviada para apoptose. Deste modo, as alterações do genoma

serão herdadas pelo clone celular, após a divisão celular, perpetuando os danos de DNA (GODWIN et al., 1997).

Sabe-se que para ocorrer transformação maligna em células de cultura requerem-se duas ou mais alterações de oncogenes e freqüentemente são necessárias quatro a seis diferentes genes alterados para o crescimento tumoral. Isto sugere que os oncogenes individualmente não são capazes de causar tumores malignos e, assim, muitos tumores não poderiam ser explicados apenas por alterações nestes genes (SKILLING & SOOD, 1997). DISAIA & CREASMAN (1997) comentam que mutações herdadas, responsáveis por predisposições pessoais ou familiares, também estão relacionadas aos oncogenes.

São conhecidos mais de 60 oncogenes associados a tumores humanos e alguns deles já foram descritos em cânceres ginecológicos (GODWIN et al., 1997). Existem várias classificações para os oncogenes, entre elas, estes podem ser divididos em: 1) fatores de crescimento; 2) receptores de fatores de crescimento, por exemplo, c-erb-B 2/neu; 3) transdutores de sinal, por exemplo, H-ras; 4) fatores de transcrição nuclear, por exemplo, c-myc e 5) receptores de membrana, por exemplo, bcl-2 (DISAIA & CREASMAN, 1997).

O oncogene c-myc foi um dos primeiros a ser estudado e inicialmente descrito em leucemia mielóide (ROWLEY, 1973), mas a mutação deste gene já foi descrita no carcinoma de colo uterino. Ele localiza-se no cromossomo 8q24, tem 3 exons, codifica proteína nuclear de 62 kilodaltons e tem vida média de

alguns minutos. Em condições normais o proto-oncogene c-myc é um conhecido fator transcricional que age regulando a progressão do ciclo celular. Codifica uma fosfoproteína nuclear, na qual há domínios de interação proteína-proteína tipo *helix-loop-helix* (HLH) e *leucine zipper* (LZ). Em outras palavras, a proteína c-myc pode ligar-se a outra proteína HLH-LZ denominada Max. A associação da proteína c-myc com a proteína max, aumentaria a afinidade de ligação ao DNA (KRETZNER, BLACKWOOD, EISENMAN, 1992).

Existe uma hipótese de que durante a fase G1 do ciclo, a expressão protéica c-myc está sob controle do gene supressor de tumor Rb e de ciclinas. O gene c-myc tem sido apontado como um importante fator de apoptose. Possivelmente este induz o gene da ornitina descaborsilase (ODC), o qual codifica uma enzima que pode produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) e causar a morte celular. O gene bcl-2 pode bloquear a apoptose por prevenir danos celulares causados pelo ERO. Quando o gene c-myc está amplificado, tem efeito inibidor sobre o gene p53 e a ciclina D1 no início do ciclo celular, enquanto tem efeito estimulador sobre as ciclinas A e E (CORY et al., 1999).

Assim, a elevada expressão da proteína c-myc é capaz de superar a parada do ciclo na fase G1/S causada pela proteína p53, bem como neutralizar o efeito da quinase dependente da ciclina D1. Deste modo, a proteína c-myc, passa a ter função paradoxal, na progressão do ciclo celular. A associação paradoxal entre os genes c-myc e bcl-2, inibindo a apoptose, pode bloquear a função supressora do gene p53 (CORY et al., 1999; SCHMIDT, 1999).

FEARON (1995), comenta que quando a expressão protéica de c-myc está desregulada, aumenta a sua vida média e pode ser detectada por método de imuno-histoquímica, mas é insuficiente para permitir a expansão clonal de uma célula com DNA alterado. Parece que são necessários vários tipos de mutações, inclusive a existência de mutações que inibam a morte celular, o que poderia ser um legado da instabilidade do genoma.

1.3. Carcinoma de colo uterino

O carcinoma de colo uterino, pode estar, quase em todos os casos, associado à infecção por vários tipos de HPV (WALBOOMERS et al., 1999). O ciclo de vida do HPV está ligado à diferenciação da célula escamosa. A infecção ocorre nas células basais do epitélio e a replicação viral produtiva começa quando as células filhas sofrem maturação. O DNA do HPV é replicado em alto número de cópias em células próximas à superfície do epitélio, onde o material genético do vírus e as proteínas do capsídeo combinam-se para formar partículas virais maduras. Uma vez ocorrida a infecção, o HPV pode permanecer latente ou sofrer replicação intranuclear ativa, com síntese de partículas infectantes. O padrão do DNA viral nas lesões benignas e malignas é diferente. Na primeira, apresenta-se sob forma circular e não integra o genoma celular (epissomal), no entanto nas lesões malignas o genoma do vírus quase sempre está integrado ao do hospedeiro (SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 2000).

O genoma viral do HPV tem determinadas seqüências que codificam proteínas chamadas de *early* (E) ou *late* (L), conforme são expressas, precocemente na replicação do DNA viral ou tardiamente na formação de seu capsídeo, respectivamente. Para ocorrer a integração do genoma do HPV ao do hospedeiro, o DNA viral rompe-se entre os genes precoces, denominados E1 e E2. A proteína produzida por E2 tem papel regulador e, se destruída, permite a expressão das proteínas E6 e E7. Acredita-se que ocorra um sinergismo entre as proteínas virais para que a apoptose seja prejudicada e a célula infectada possa ser imortalizada, garantindo a perpetuação de genoma viral na célula hospedeira (POESCHLA & WONG-STAAAL, 1997; SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 2000).

No caso do carcinoma de colo uterino, estudos bioquímicos demonstram que a proteína E6, expressa pelo HPV, é capaz de ligar-se a proteína p53, através da proteína E6AP, formando o complexo p53-E6AP-E6, que é rapidamente inativado através da via proteolítica dependente da ubiquitina. Como a proteína p53 está inativa, não há parada do ciclo para o reparo de DNA e o ciclo celular prossegue com o genoma do HPV integrado ao do hospedeiro (POESCHLA & WONG-STAAAL, 1997; CHO, 1998).

No entanto para ocorrer alterações de vários genes reguladores do ciclo celular, prejuízo da apoptose, instabilidade gênica e acúmulo de mutações é necessário que a integração do HPV ao hospedeiro mantenha-se de forma persistente. No início deste processo, as mutações que vão ocorrendo no gene p53 mantém ainda a sua heterozigose, ou seja os dois braços do cromossomo

ainda estão presentes. A forma mutante do gene coexiste com a forma normal (selvagem), codificando proteínas mutante e normal ao mesmo tempo, as quais formam um oligômero complexo entre elas. Neste oligômero pode haver predomínio da função da proteína mutante sobre a normal, porém a função supressora ainda é mantida parcialmente pois se mantém porcentagens variáveis de apoptose. No entanto, com o tempo, a perda parcial da apoptose causa instabilidade do genoma e o acúmulo de mutações pode levar a perda da heterozigose, ou seja, há deleção do braço curto do cromossomo 17, restando somente proteína p53 mutante, cuja função não regula o ciclo celular (GODWIN et al., 1997).

Já foi estudado o mecanismo de ação do HPV e as possíveis mutações do gene c-myc que ocorrem no carcinoma de colo uterino. Um dos primeiros estudos sobre o assunto sugeriu que a integração do HPV no genoma do hospedeiro ocorreria em sítios frágeis próximos ao gene c-myc, de modo que a mutagênese insercional poderia ser um dos mecanismos de oncogênese deste vírus. Tal estudo demonstrou a presença de seqüências de HPV na banda 8q24,1 que é a mesma do gene c-myc (CANNIZARO et al.; 1988). No entanto, tal inferência parece não ser o principal mecanismo responsável pelas mutações neste gene, pois a própria instabilidade do genoma, gerada pela presença do HPV poderia causar acúmulo de mutações no gene c-myc, da mesma forma que ocorre no gene p53 (CHO, 1998).

Portanto, parece que a carcinogênese do epitélio do colo uterino é um processo evolutivo complexo, facilitado por uma maior instabilidade genética, no

qual a perda do sinal de apoptose representa importante papel na expansão clonal da célula tumoral. Considerar cada gene como protagonista isolado na apoptose é negligenciar a importante interação e convergência das diversas vias que a regulam. O presente estudo enfoca apenas a expressão protéica dos genes p53 e c-myc, as quais participam desta maquinaria altamente especializada que é o ciclo celular.

A expressão protéica do gene p53 foi analisada devido a sua importância na regulação do ciclo celular. Alguns pesquisadores têm estudado esta proteína como marcador no prognóstico do carcinoma de colo uterino e demonstraram tal associação, estudando CEC (NAKANO, OKA, TANIGUCHI, 1996), ou adenocarcinoma (TSUDA et al., 1995), ou adenocarcinoma e carcinoma adeno-escamoso (UCHIYAMA et al., 1997). No entanto alguns autores, não encontraram associação prognóstica estudando somente CEC (KAINZ et al., 1995; EBARA et al., 1996), ou estudando vários tipos histológicos: CEC, adenocarcinoma e carcinoma adeno-escamoso (BREMER et al., 1995; HUNT et al., 1996; SKOMEDAL et al., 1999), ou somente adenocarcinoma (TENTI et al., 1998). Isto significa que o valor prognóstico da proteína p53 ainda não foi bem estabelecido para CEC de colo uterino.

A expressão protéica do gene c-myc foi analisada por ser o produto de um dos genes relacionados a apoptose, cuja mecanismo de ação está relacionado ao do gene p53, como descrito anteriormente. Com relação a proteína c-myc, pode-se citar estudos que demonstraram associação prognóstica com a recidiva da doença, com metástases a distância e com o menor intervalo livre de doença

(RIOU, 1988; SOWANI et al., 1989; BOURHIS et al., 1990; RIOU, BOURHIS, LE, 1990).

DISAIA & CREASMAN (1997) comentam que a amplificação do gene c-myc é uma alteração freqüente nos cânceres e pode contribuir para a sua progressão, bem como já foi descrito na resistência tumoral quimioterapia, o que significa que o valor prognóstico da proteína c-myc já foi estabelecido. No entanto alguns autores não demonstraram tal associação (BREWER et al., 1996; POLISCHOUK et al., 1997).

No entanto, a maioria dos estudos foram realizados em países desenvolvidos, com boa cobertura populacional dos programas de rastreamento do câncer de colo uterino, o que poderia interferir nos resultados obtidos. Como conseqüência, estes estudos incluíram predominantemente mulheres com câncer nos estádios I e II e poucos casos em estádios mais avançados.

Sabe-se que também existe um efeito seletivo que pode ocorrer pela ação dos programas de rastreamento. Os tumores que têm crescimento lento são mais facilmente detectáveis pelos rastreamentos e estas mulheres têm melhor prognóstico e maior sobrevida. No entanto aqueles com crescimento rápido, podem desenvolver-se clinicamente durante o intervalo destes rastreamentos e estas pacientes têm prognóstico ruim e menor sobrevida. Esta tendência denomina-se *length bias*. (MACLEAN, 1996).

Deve-se também considerar que poucos destes estudos selecionaram as mulheres segundo o tipo histológico do carcinoma. Alguns, analisaram o CEC, o

adenocarcinoma e o carcinoma adeno-escamoso juntos; outros analisaram apenas adenocarcinoma e carcinoma adeno-escamoso. Sabe-se que estes tipos histológicos, em geral, são menos freqüente, têm evolução mais rápida e são mais agressivos quando comparados ao CEC (FIGO, 1998).

Há pouca informação sobre o valor prognóstico das proteínas p53 e c-myc nos países em desenvolvimento, como o Brasil, cuja cobertura dos programas para rastreamento do carcinoma de colo uterino é baixa. A prática do exame de Papanicolaou geralmente é inadequada (BRENNAN, 1996), portanto é grande o número de casos avançados da doença.

Este estudo pretendeu analisar a expressão protéica de p53 e c-myc, em uma amostra da população brasileira e a sua associação prognóstica com o carcinoma de colo uterino. Espera-se agregar mais conhecimento sobre o CEC e mais do isto, existe a expectativa de que este estudo possa indicar novas etapas na identificação de genes e suas expressões protéicas envolvidos na evolução deste câncer. A identificação de possíveis marcadores prognósticos poderá servir, em futuro próximo, para selecionar o tratamento mais adequado e para um melhor delineamento do seguimento clínico nas mulheres com esta doença.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Analisar a associação da expressão protéica do gene supressor de tumor p53 e do oncogene c-myc com o prognóstico do carcinoma espino-celular (CEC) invasivo de colo uterino.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a frequência da expressão protéica de p53 e c-myc no CEC.
- Relacionar a faixa etária e o tempo de atividade sexual das mulheres com a expressão protéica de p53 e c-myc.
- Estudar a associação da expressão protéica de p53 e c-myc com a sobrevida total e livre de doença, estratificada por estágio clínico.

- Analisar a relação da expressão protéica de p53 e c-myc com a sobrevida total e livre de doença, nas mulheres com controle clínico da doença pós-tratamento (CCDPT).

3. Casuística e Métodos

3.1. Desenho do estudo

Este estudo foi de coorte.

3.2. Tamanho amostral

Foi calculado pelo Epi-Info 6.04, a fim de atender à análise de sobrevivência total e livre de doença .

- A sobrevivência livre de doença em mulheres com carcinoma de colo uterino, estágio III, (EBARA et al., 1996), o número mínimo de mulheres poderia ser de 66, baseado nos seguintes parâmetros:
 - Mulheres não expostas ao risco de recidiva foram aquelas sem expressão proteica de p53. Ao final do estudo, 69% delas não apresentaram recidiva e 31% apresentaram recidiva.
 - Mulheres expostas ao risco de recidiva foram aquelas com expressão proteica de p53. Ao final do estudo, 70% delas não apresentaram recidiva e 30% apresentaram recidiva.

- Ψ : razão de riscos de recidiva expostos/não expostos de 1:1.
 - α : nível de significância ou erro tipo I de 5% e intervalo de confiança $(1-\alpha)$ de 95%.
 - β : nível de significância ou erro tipo II de 20% e poder $(1-\beta)$ de 80%.
- A sobrevida total de doença para as mulheres com carcinoma de colo uterino, estádios Ib a IIb, (BOURHIS et al., 1990), o número mínimo de mulheres poderia ser de 98, baseado nos seguintes parâmetros:
- Mulheres não expostas ao risco de morte foram aquelas sem expressão protéica de c-myc. Ao final do estudo, 93% delas sobreviveram e 7% morreram.
 - Mulheres expostas ao risco de óbito foram aquelas com expressão protéica de c-myc. Ao final do estudo, 51% delas sobrevivem e 49% morrem.
 - Ψ : razão de risco de óbito entre expostos/não expostos de 1:7.
 - α : nível de significância ou erro tipo I de 5% e intervalo de confiança $(1-\alpha)$ de 95%.
 - β : nível de significância ou erro tipo II de 20% e poder $(1-\beta)$ de 80%.

3.3. Seleção dos sujeitos

Os sujeitos da pesquisa foram selecionados através dos registros das mulheres admitidas nos Ambulatórios de Oncologia Ginecológica do Hospital-Maternidade Leonor Mendes de (HMLMB) - São Paulo – Secretária de Estado da Saúde e do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) -

Departamento de Tocoginecologia – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Tratam-se de instituições do Sistema Único de Saúde que prestam atendimento secundário e terciário, à população proveniente do Estado de São Paulo e de várias regiões do Brasil.

Foram utilizados blocos de parafina arquivados, com material de colo uterino obtido por biópsia, no momento do diagnóstico destas mulheres. As informações clínicas foram obtidas através dos prontuários.

Foram incluídas todas as mulheres com diagnóstico histológico de CEC invasivo de colo uterino, com estágio clínico entre Ib a III segundo a Federação Internacional de Ginecologia (FIGO), diagnosticadas no período de 1992 a 1994. Foram excluídas aquelas mulheres cujos blocos de parafina não foram localizados ou cujo fragmento de tecido foi insuficiente para a realização da técnica proposta.

Assim, de um total de 310 mulheres, apenas 287 preenchem os critérios de inclusão, segundo tipo histológico e estágio. Destas, 49 blocos de parafina não foram encontrados e 18 não tinham tecido suficiente para serem submetidos à técnica laboratorial. Restaram 220 mulheres que foram incluídas neste estudo, 39 provenientes dos arquivos do HMLMB e 181 do CAISM, nas quais o carcinoma foi diagnosticado nos estádios I, II e III em 48, 61 e 111, respectivamente.

3.4. Variáveis e conceitos

3.4.1. Independentes

- Expressão protéica do gene supressor de tumor p53:
 - Positiva - foi considerada quando houve reatividade nuclear, corando-se os núcleos em castanho (LAMBKIN, MOTHERSIL, KELEHAN, 1994).
 - Negativa - ausência de reatividade nuclear.

- Expressão protéica do oncogene c-myc:
 - Positiva - foi considerada quando houve reatividade nuclear, corando-se os núcleos em castanho. Embora o método de imunohistoquímica possa mostrar coloração tanto nuclear quanto citoplasmática para a proteína c-myc, recomenda-se considerar principalmente a reação nuclear (STAGLE et al., 1998).
 - Negativa – ausência de reatividade nuclear.

3.4.2. Dependentes

- Sobrevida total: definida como o tempo em meses completos, decorrido do momento do diagnóstico anatomopatológico até à morte. Caso não tenha ocorrido o evento, a sobrevida é considerada até os 60 meses (FLETCHER, FLETCHER, WAGNER, 1996).

- Sobrevida livre de doença: definida como tempo em meses completos, decorrido do término do tratamento oncológico inicial até a recidiva do

carcinoma. Caso não tenha ocorrido o evento, a sobrevida é considerada até os 60 meses (FLETCHER et al., 1996).

3.4.3. Confundidora

Trata-se de variável que pode confundir a causa dificultando a avaliação do desfecho final (FLETCHER et al., 1996).

- Estádios CEC invasivo (FIGO, 1998).
 - I. carcinoma limitado ao colo clinicamente visível e invasão estromal acima de cinco milímetros, que corresponde ao estágio Ib.
 - II. carcinoma que invade ao redor do útero, sem atingir parede pélvica nem um terço inferior de vagina.
 - III. carcinoma que se estende até a parede pélvica ou envolve um terço inferior de vagina, incluídos os casos de hidronefrose e disfunção renal.

3.4.4. De trajetória prognóstica

Tratam-se de variáveis de causa remota que podem agir na causa intermediária ou na variável confundidora (FRANCO, 1991).

- Idade da mulher: expressa em anos completos.
- Tempo de atividade sexual: tempo, em anos completos, decorrido desde o primeiro coito até o momento do diagnóstico da doença.

3.4.5. Outros conceitos

- Tratamento inicial - aquele instituído até 120 dias do diagnóstico (FIGO, 1998).
- Controle clínico da doença pós-tratamento (CCDPT) – ausência clínica de doença avaliada pelo exame ginecológico, realizada até três meses após o término do tratamento.

3.5. Coleta de dados

3.5.1. Informações clínicas

As informações foram coletadas a partir dos prontuários das pacientes, em fichas elaboradas especificamente para esta finalidade (Anexo 1). Nos casos de dados incompletos ou duvidosos, as pacientes ou familiares foram convocados para entrevista com a assistente social.

3.5.2. Seguimento e critérios de descontinuação

O tratamento proposto inicialmente, foi baseado no estágio da doença, como predominantemente cirúrgico no estágio I e predominantemente radioterápico nos estágios II e III. As mulheres foram acompanhadas em ambulatório semestralmente ou em menor intervalo quando necessário, com exame físico e subsidiários como colpocitologia oncológica, colpovaginoscopia com biópsia se necessário, provas de função renal, urina I e urocultura com antibiograma se necessário, ultra-sonografia pélvica ou abdominal e de vias urinárias, urografia

excretora e cistoscopia, quando necessários, até completarem cinco anos do diagnóstico ou até o óbito.

Nos casos de abandono do seguimento, uma assistente social procurou localizar as pacientes e convocá-las a retornarem ou então identificar algum familiar ou vizinho que pudesse ter informações atualizadas. Utilizou-se também informações de registro de óbitos de outros hospitais. Entre as 220 mulheres incluídas, 11% (25) abandonaram o seguimento e não foi possível obter informações atualizadas sobre elas, ao final dos 60 meses.

3.5.3. Seleção do material biológico

Foram identificados os números das lâminas e dos blocos de parafina correspondentes às mulheres selecionadas para o estudo. Este material foi procurado nos arquivos dos laboratórios de patologia e buscou-se inclusive em laboratórios localizados em outros municípios, através de contato postal.

3.6. Processamento laboratorial

Os blocos de parafina contendo material de colo uterino, foram processados, no Laboratório de Patologia Experimental, CAISM, Departamento de Patologia, Unicamp, de acordo com a técnica descrita abaixo. Foram reavaliadas as lâminas coradas em hematoxilina-eosina (HE), correspondentes aos blocos, para confirmação diagnóstica, antes do corte dos mesmos para a técnica proposta.

3.6.1. Cortes histológicos

Secções de 4µm são colocadas em lâminas previamente lavadas e desengorduradas, tratadas em solução de organossilano a 25% em acetona (3-Aminopropil-trietoxi-silano - SIGMA cod A3648). As lâminas com os cortes são deixadas à temperatura ambiente até o momento da reação imuno-histoquímica (30 minutos).

3.6.2. Técnica de Imuno-histoquímica

Foram usados anticorpos primários: para p53 utilizou-se Dako clone D07, cod M7001, com diluição 1:100 e para c-myc utilizou-se Santa Cruz Biotechnology MX 9E10, com diluição 1:80. A diluição foi realizada com BSA (soro albumina bovina).

- Reação de imunoperoxidase:
 - Etapa I: desparafinização.
 1. Colocar o xilol na estufa a 110° C por ± 30 minutos. Fazer várias lavagens.
 2. Xilol II e III em temperatura ambiente. Fazer várias lavagens.
 3. Álcool absoluto I, II, III em temperatura ambiente. Fazer várias lavagens.
 4. Lavagem em água corrente e destilada.
 5. Colocar em tampão citrato pH 6,0, em panela de vapor a 100° C (TAYLOR, SHI, COTE, 1993) por sete minutos, três vezes; deixar esfriar por 15 minutos.

6. Lavagem em água corrente e destilada.
7. Bloqueio da peroxidase endógena: Incubar por 15 minutos em temperatura ambiente, em solução 3%: H₂O₂ (30%).... ...15ml
Metanol.....135ml
8. Lavagem em água corrente e destilada. Colocar em tampão PBS (phosphate buffer saline, pH 7,6).
9. Pingar os anticorpos primários específicos. Incubar em câmara úmida 30 minutos a 37° C.

Colocar na geladeira *overnight*.

- Etapa II: coloração

10. Retirar as lâminas da incubação com anticorpos primários e fazer três lavagens, no agitador, em PBS de cinco minutos cada a temperatura ambiente.
11. Secar com papel de filtro e pingar o anticorpo secundário biotilnado kit Multilink Dako, cod. E453 (este anticorpo é capaz de ligar-se ao primário e conjugar-se a biotina, e o complexo de peroxidase liga-se a estreptavina e a biotina); seguido de incubação por uma hora na estufa a 37° C.
12. Terminada a incubação, fazer três lavagens, no agitador, em PBS de cinco minutos cada a temperatura ambiente.
13. Secar com papel filtro e pingar o complexo ABC (kit Dako, cod K377). Incubar por 40 minutos a 37° C em estufa.
14. Terminado o tempo, colocar as lâminas em tampão PBS e preparar o DAB (3,3 tetra-hidrocloro de diamino-benzina,

Sigma D5637), cromógeno de cor marrom que impregna o local onde ocorre reação. Sendo que:

DAB.....60mg

PBS.....100mg

H₂O₂ (30%)...500µg

DMSO.....1ml (Dimethylsulfoxide)

Misturar a solução e colocar as lâminas para corar por cinco minutos.

15. Lavar em água corrente e passar em água destilada.
16. Contracorar com Hematoxilina de Mayer por 30 a 60 segundos. Lavar novamente.
17. Passar por alguns segundos em água amoniacal, por água corrente e destilada.
18. Desidratar por três passagens em álcool absoluto e três em xílo e montar as lâminas.

3.6.3. Leitura da lâminas

Os exames para a proteína p53 foram analisados por um patologista e os exames para a proteína c-myc, por outro patologista. O controle de qualidade das reações foi feito pela leitura de controle positivos e negativos para ambas proteínas. A positividade nuclear de ambas proteínas (Fotos 1 a 6) foi classificada inicialmente como: leve (ou +) – até 20%, moderada (ou ++) – até 60% e acentuada (ou +++) – acima de 60%.



Foto 1. Reatividade nuclear da proteína p53 (imunoperoxidase x 200)

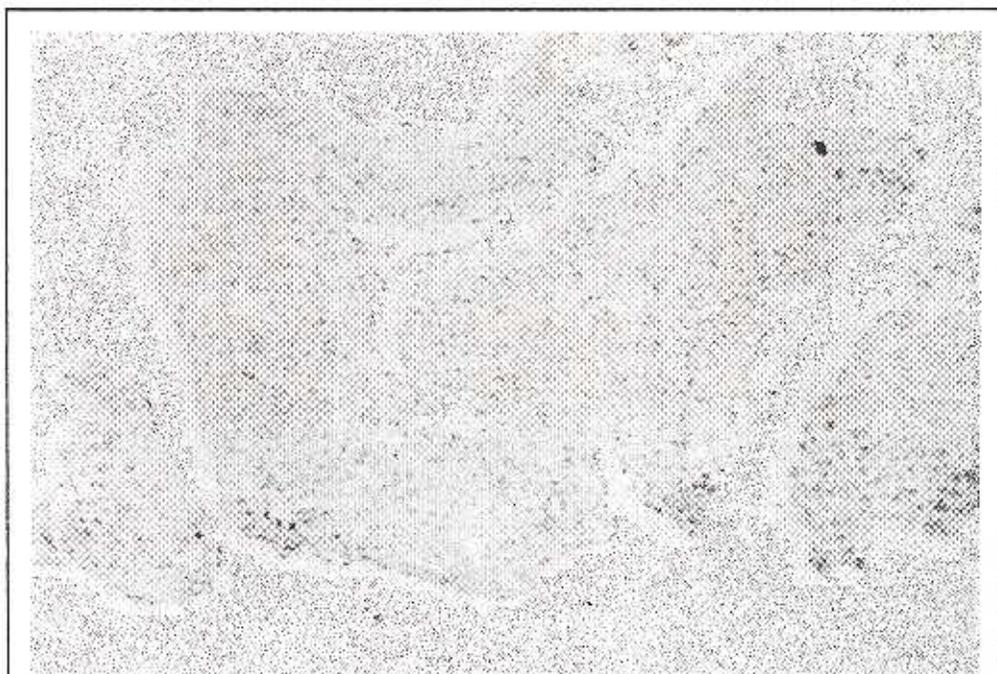


Foto 2. Reatividade nuclear da proteína c-myc (imunoperoxidase x 200)

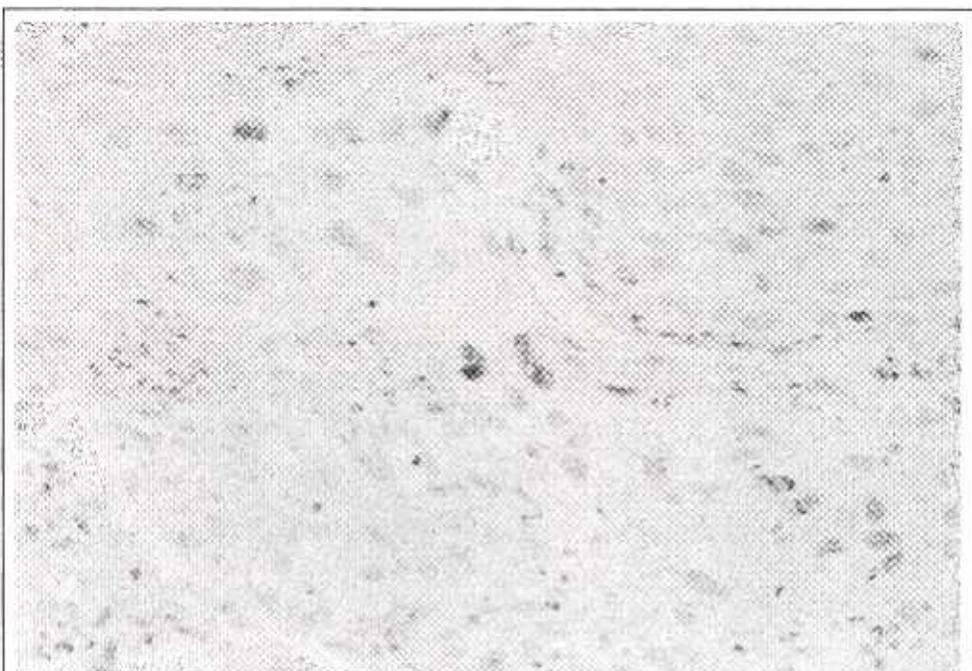


Foto 3. *Reatividade nuclear da proteína p53 (imunoperoxidase x 400)*

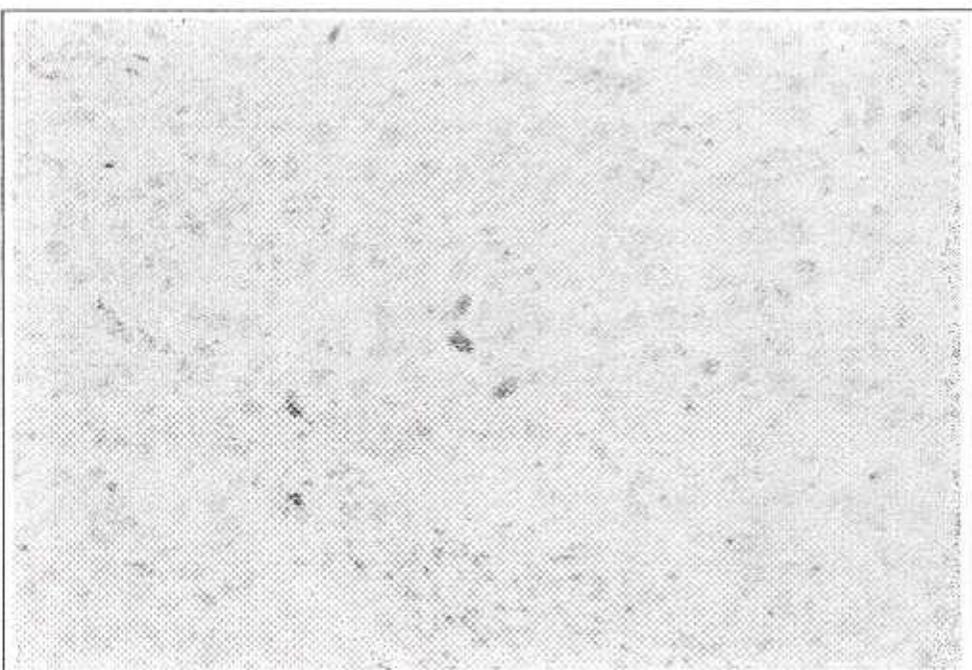


Foto 4. *Reatividade nuclear da proteína p53 (imunoperoxidase x 400)*



Foto 5. Reatividade nuclear da proteína c-myc (imunoperoxidase x 400)

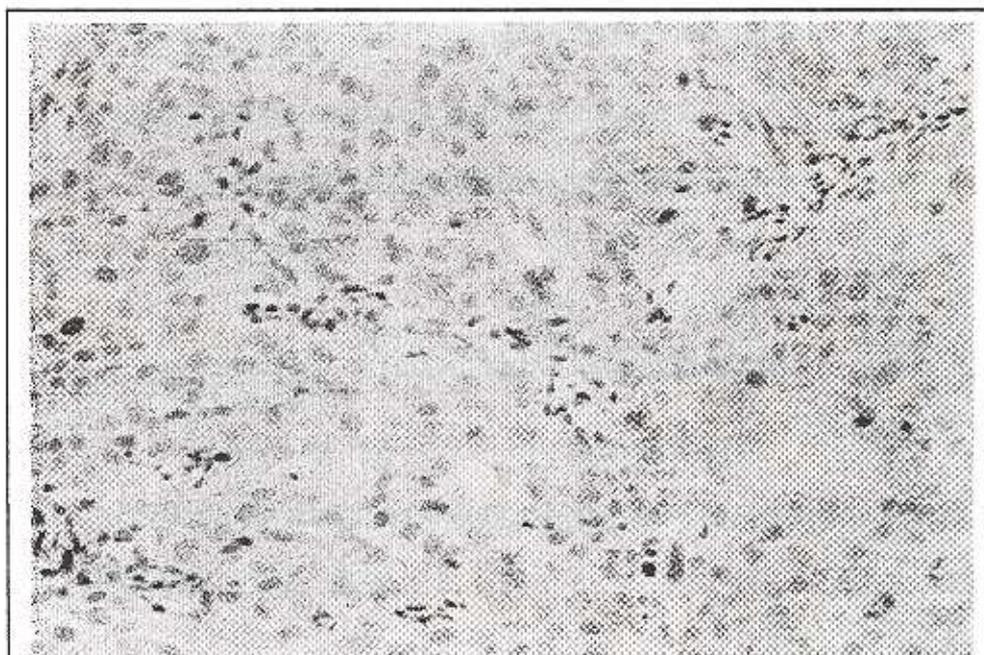


Foto 6. Reatividade nuclear da proteína c-myc (imunoperoxidase x 400)

3.7. Análise dos dados

As fichas preenchidas foram revisadas e as informações foram codificadas e digitadas em de banco de dados no programa Excel 5.0. Este foi revisado, para avaliação da consistência dos dados e submetido à análise estatística no programa Statistical Analysis System (SAS).

Análise descritiva: inicialmente as características da amostra foram mostradas em tabelas descritivas. Calculou-se a freqüência de mulheres em cada estágio clínico do carcinoma. A idade e o tempo de atividade sexual foram descritos através de suas médias, valores mínimos e máximos, e desvios-padrão. Também foi calculada a freqüência da expressão protéica de p53 e c-myc.

Análise de tendência: para tal análise utilizou-se tabelas de contingência de dupla entrada, apresentando-se os resultados em tabela única resumida. A correlação entre as variáveis foi feita pelo teste de tendência linear de Cochran-Armitage (EVERITT, 1992).

Análise de sobrevida: a proporção acumulada da sobrevida total e livre de doença foi estudada pelo método de Kaplan-Meier (KAPLAN & MEIER, 1958), para todas as variáveis do estudo, considerando-se a expressão de p53 e c-myc estratificada por estágios e nas mulheres com controle clínico da doença pós tratamento. As mulheres que ao longo do seguimento de 60 meses não morreram, não tiveram recidiva, ou abandonaram o estudo, foram consideradas “censuradas” e aquelas que morreram até 60 meses foram

consideradas “não censuradas”. Esta análise consistiu no cálculo da taxa de sobrevivência ou *survival rate* (SR), da razão da taxa de sobrevivência *survival rate ratio* (SRR), mostradas em três pontos distintos no tempo: aos 12, 36 e 60 meses. Também efetuou-se o cálculo da razão de risco ou *hazard ratio* (HR), para o risco de morte e recidiva da doença ao final dos 60 meses, quando este foi constante no tempo, aceitando-se intervalo de confiança (IC) de 95%. Também foram construídas curvas de sobrevida, comparadas pelo teste de Wilcoxon ou pelo teste de log-rank, aceitando-se uma diferença significativa de $p=0,05$. Estes testes são de natureza não-paramétrica e a sua utilização segue a seguinte regra: se as curvas de sobrevida se cruzam, o que significa que não existe a hipótese de proporcionalidade de riscos (de óbito ou de recidiva), usa-se o teste de Wilcoxon; se as curvas não se cruzam, usa-se o teste de log-rank (LEE, 1980).

Modelo de regressão de riscos proporcionais de Cox: a expressão protéica de p53 e c-myc foi analisada, estratificada por estágio e também nas mulheres com CCDPT, pelo modelo de regressão de riscos proporcionais de Cox (COX, 1972) em três períodos de tempo: 0 a 12, de 12 a 36 e após 36 meses, para risco de morte e recidiva do carcinoma.

3.8. Aspectos éticos

O estudo foi desenvolvido à partir de dados obtidos das fichas de atendimento clínico da rotina dos Ambulatórios de Oncologia Ginecológica, e do material de arquivo (blocos de parafina) dos respectivos serviços de Patologia onde foi realizado o diagnóstico. As informações obtidas foram mantidas em sigilo, sendo que, a paciente foi identificada apenas por um número.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e do Hospital-Maternidade Leonor Mendes de Barros.

4. Resultados

4.1. Características da amostra

As 220 mulheres com carcinoma de colo uterino, tinham idade entre 25 e 89 anos quando foi realizado o diagnóstico da doença, com média de 53,4 anos. O tempo de atividade sexual variou entre 11 a 69 anos, com média de 35,8 anos. Metade (50%) das pacientes eram portadoras de carcinoma no estágio clínico III e as demais distribuíram-se entre os estádios I e II em 22% e 28% respectivamente (TABELA 1).

TABELA 1. Características das mulheres com carcinoma de colo uterino

Estádio	n (%)	Idade (anos)		Tempo de atividade sexual (anos)	
		Média (\pm DP)	Min-Máx	Média (\pm DP)	Min-Máx
I	48 (22)	46,1(\pm 11,5)	28-74	28,4 (\pm 9,3)	13-49
II	61 (28)	51,8 (\pm 11,2)	32-75	34,0 (\pm 11,7)	16-59
III	111 (50)	57,7 (\pm 12,8)	25-89	40,0 (\pm 12,4)	11-69
Total	220 (100)	53,4 (\pm12,9)	25-89	35,8 (\pm12,4)	11-69

Min-Máx – Mínimo-Máximo
DP – desvio padrão

A proteína p53 foi detectada em 35% das mulheres e a proteína c-myc em 42% delas. No entanto observou-se o predomínio da expressão protéica leve (< 20%), na maioria dos casos positivos, ou seja, em 26% dos casos para a proteína p53 e em 29% para a proteína c-myc. Os demais casos positivos distribuíram-se entre as formas moderada (20-60%) e acentuada (> 60%), em 7% e 2% para p53 e em 9% e 2% para c-myc, respectivamente (TABELA 2). Devido a baixa frequência na expressão moderada e acentuada, reagruparam-se ambas aos casos com expressão leve e considerou-se todos como positivos, a fim de viabilizar a análise estatística para sobrevivida.

TABELA 2. Distribuição da amostra segundo as proteínas p53 e c-myc

Expressão	p53		c-myc	
	n	%	n	%
Negativa	143	65	131	60
Positiva	77	35	89	40
< 20%	58	26	65	29
20-60%	15	7	19	9
> 60%	4	2	5	2
Total	220	100	220	100

4.2. Tendências

A proteína p53 foi mais freqüente nas pacientes com menos de 40 anos e apresentou tendência a diminuir linearmente conforme aumentou a faixa etária. A proteína c-myc foi mais freqüente naquelas com menos de 25 anos de atividade sexual e também apresentou tendência linear a diminuir conforme aumentou o tempo de atividade sexual. Estas tendências foram confirmadas pelo teste de tendência linear de Cochran-Armitage, para a proteína p53 ($p=0,03$) e para a proteína c-myc ($p=0,03$), respectivamente, com relação a faixa etária e ao tempo de atividade sexual (TABELA 3).

TABELA 3. Distribuição das variáveis segundo as proteínas p53 e c-myc nas mulheres com carcinoma de colo uterino

Variáveis	p53		$p^{(1)}$	c-myc		$p^{(1)}$
	Negativo	Positivo		Negativo	Positivo	
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
Faixa etária (anos)						
< 40	21 (58)	15 (42)	0,03	20 (56)	16 (44)	0,11
40 a 55	49 (60)	33 (40)		43 (52)	39 (48)	
56 a 70	52 (68)	24 (32)		51 (67)	25 (33)	
> 70	21 (81)	5 (19)		17 (65)	9 (35)	
TAS ⁽²⁾ (anos)						
< 25	36 (63)	21 (37)	0,49	29 (51)	28 (49)	0,03
25 a 35	32 (59)	22 (41)		30 (56)	24 (44)	
36 a 45	43 (72)	17 (28)		38 (63)	22 (37)	
> 45	32 (65)	17 (35)		34 (69)	15 (31)	
Total	143 (65)	77 (35)		131 (60)	89 (40)	

(1) teste de tendência de Cochran-Armitage
TAS – tempo de atividade sexual

4.3. Sobrevida

Analisando-se a taxa de sobrevivência ou *survival rate* (SR), calculada pelo método de Kaplan-Meier, e a razão da taxa de sobrevivência ou *survival rate ratio* (SRR), com seu respectivo intervalo de confiança (IC) de 95%, notou-se, globalmente para todas as variáveis, que somente o estágio clínico do carcinoma de colo uterino associou-se com a sobrevida total e livre de doença (TABELAS 4 e 5). As curvas de sobrevida total e livre de doença correspondentes aos estádios da doença encontram-se no Anexo 3 (FIGURA 9 e 10). Por este motivo esta variável foi considerada confundidora e a análise de sobrevida foi estratificada por estádios clínicos.

Tomando-se como referencial a sobrevida total no estágio I, aos 12 meses, o estágio II apresentou SRR de 0,9 (IC 0,8-1,0) e, esteve muito próximo ao limite da significância, considerando-se o IC. Esta associação manteve-se aos 36 e 60 meses, com SRR de 0,6 (IC 0,4-0,8) e 0,4 (IC 0,3-0,6) respectivamente. O mesmo foi observado para o estágio III, aos 12, 36 e 60 meses, com SRR de 0,5 (IC 0,4-0,7); 0,3 (IC 0,2-0,5) e 0,2 (IC 0,1-0,4) respectivamente (TABELA 4).

Ainda para a sobrevida total, houve diminuição da SRR e da SR conforme aumentou o estágio clínico e o tempo de seguimento, ou seja, como esperado, o número de sobreviventes foi menor nos estádios mais avançados e ao longo do tempo. Considerou-se $p < 0,01$, calculado pelo método de Wilcoxon

ou log-rank, ao final dos 60 meses, para todos os estádios. A razão de risco ou *hazard ratio* (HR) de morte ao final dos 60 meses foi 3,2 vezes maior (IC 1,6-6,3) para o estágio II e 4,4 vezes maior (IC 2,3-8,4) para o estágio III (TABELA 4).

Com relação a sobrevida livre de doença, a SR e a SRR mantiveram a mesma associação mostrada para a sobrevida total, diminuindo à medida que aumentaram o estágio e o tempo de seguimento. Assim, o estágio II mostrou aos 12, 36 e 60 meses, SRR de 0,7 (IC 0,5-0,9); 0,5 (IC 0,3-0,7) e 0,4 (IC 0,2-0,7) respectivamente. Já o estágio III mostrou 0,4 (IC 0,3-0,6); 0,3 (IC 0,2-0,5) e 0,4 (IC 0,2-0,6). A HR para recidiva ao final dos 60 meses foi 2,2 vezes maior (IC 1,2-4,0) para o estágio II e 3,3 vezes maior (IC 1,9-5,5) para o estágio III, com $p < 0,01$ (TABELA 5).

TABELA 4. Sobrevida total das mulheres segundo estágio do carcinoma de colo uterino e proteínas p53 e c-myc

Variáveis	n	Sobrevida total							p	HR (IC 95%)
		Óbitos (n)	Aos 12 meses		Aos 36 meses		Aos 60 meses			
			SR (%)	SRR (IC 95%)	SR (%)	SRR (IC 95%)	SR (%)	SRR (IC 95%)		
Estádio										
I	48	8	95	1,0	88	1,0	81	1,0	<0,01 ⁽²⁾	1
II	61	33	91	0,9 (0,8–1,0)	55	0,6 (0,4-0,8)	38	0,4 (0,3 – 0,6)		3,2 (1,6-6,3)
III	111	82	57	0,5 (0,4–0,7)	33	0,3 (0,2-0,5)	23	0,2 (0,1 – 0,4)		4,4 (2,3-8,4)
p53										
Positivo	77	38	74	1,0	50	1,0	45	1,00	0,57 ⁽¹⁾	NS
Negativo	143	85	74	1,0 (0,8–1,1)	51	1,0 (0,7-1,3)	37	0,8 (0,5 – 1,1)		
c-myc										
Positivo	89	53	77	1,0	46	1,00	35	1,00	0,55 ⁽¹⁾	NS
Negativo	131	70	72	0,9 (0,8–1,1)	54	1,1 (0,8-1,5)	42	1,1 (0,8 – 1,7)		
Total	220	123	74		51		39			

SR - taxa de sobrevivência, SRR - razão da taxa de sobrevivência, HR – razão de risco, IC - intervalo de confiança
TAS - tempo de atividade sexual, (1) teste de Wilcoxon, (2) teste de log-rank, NS - não significativa

TABELA 5. Sobrevida livre de doença das mulheres segundo estágio do carcinoma de colo uterino e proteínas p53 e c-myc

Variáveis	n	Sobrevida livre de doença							p	HR (IC 95%)
		Recidivas (n)	Aos 12 meses		Aos 36 meses		Aos 60 meses			
			SR (%)	SRR (IC 95%)	SR (%)	SRR (IC 95%)	SR (%)	SRR (IC 95%)		
Estádio										
I	48	17	80	1,0	72	1,00	60	1,0	<0,01 ⁽²⁾	1
II	61	39	60	0,7 (0,5 – 0,9)	37	0,5 (0,3-0,7)	24	0,4 (0,2 – 0,7)		2,2 (1,2-4,0)
III	111	83	36	0,4 (0,3 – 0,6)	28	0,3 (0,2-0,5)	24	0,4 (0,2 – 0,6)		3,3 (1,9-5,6)
p53										
Positivo	77	48	50	1,0	40	1,0	31	1,0	0,81 ⁽¹⁾	NS
Negativo	143	91	53	1,0 (0,7 – 1,3)	41	1,0 (0,7-1,4)	33	1,0 (0,6 – 1,6)		
c-myc										
Positivo	89	61	47	1,0	37	1,0	25	1,0	0,67 ⁽¹⁾	NS
Negativo	131	78	55	1,1 (0,8 – 1,5)	40	1,2 (0,8-1,7)	37	1,4 (0,9 – 2,2)		
Total	220	123	52		40		32			

SR - taxa de sobrevivência, SRR - razão da taxa de sobrevivência, HR – razão de risco, IC - intervalo de confiança
TAS - tempo de atividade sexual, (1) teste de Wilcoxon, (2) teste de log-rank, NS - não significante

Assim, considerando-se que o estágio foi variável confundidora, a análise de sobrevida total e livre de doença foi estratificada por estádios para que se pudesse qualificar o valor prognóstico das proteínas p53 e c-myc. Analisou-se a SR com relação a sobrevida total e livre de doença em três pontos no tempo: 12, 36 e 60 meses de seguimento, para a expressão protéica de p53 (TABELA 6) e para c-myc (TABELA 7).

A proteína p53 não associou-se com a sobrevida total em nenhum dos estádios clínicos. No entanto mostrou associação significativa com a sobrevida livre de doença ($p=0,01$) e HR para recidiva, ao final dos 60 meses, 2 vezes maior (IC 1,1-1,3), apenas para as mulheres no estágio II (TABELA 6). A curva de sobrevida livre de doença, no estágio II, nas mulheres com proteína p53 positiva sempre esteve abaixo das demais mulheres (Figura 2). O mesmo não ocorreu com relação ao estágio I (Figura1) e estágio III (FIGURA 3).

TABELA 6. Sobrevida total e livre de doença de mulheres com proteína de p53, estratificadas por estágio do carcinoma

Variáveis	n	Sobrevida total					Sobrevida livre de doença						
		Óbitos (n)	SR (%) em meses			p ⁽¹⁾	HR (IC 95%)	Recidivas (n)	SR (%) em meses			p ⁽¹⁾	HR (IC 95%)
			12	36	60				12	36	60		
Estádio I													
P53													
Positivo	19	1	94	94	94	0,16	NS	5	82	82	67	0,45	NS
Negativo	29	7	96	85	74			12	78	66	55		
Estádio II													
p53													
Positivo	26	14	96	46	36	0,28	NS	19	43	24	14	<0,01	2,0 (1,1-3,9)
Negativo	35	19	94	62	38			20	72	45	35		
Estádio III													
p53													
Positivo	32	23	53	30	26	0,88	NS	24	38	27	24	0,91	NS
Negativo	79	59	58	34	22			59	35	28	23		
Total	220	123						139					

SR - taxa de sobrevivência, HR – razão de risco, IC - intervalo de confiança teste de Wilcoxon, NS – não significante

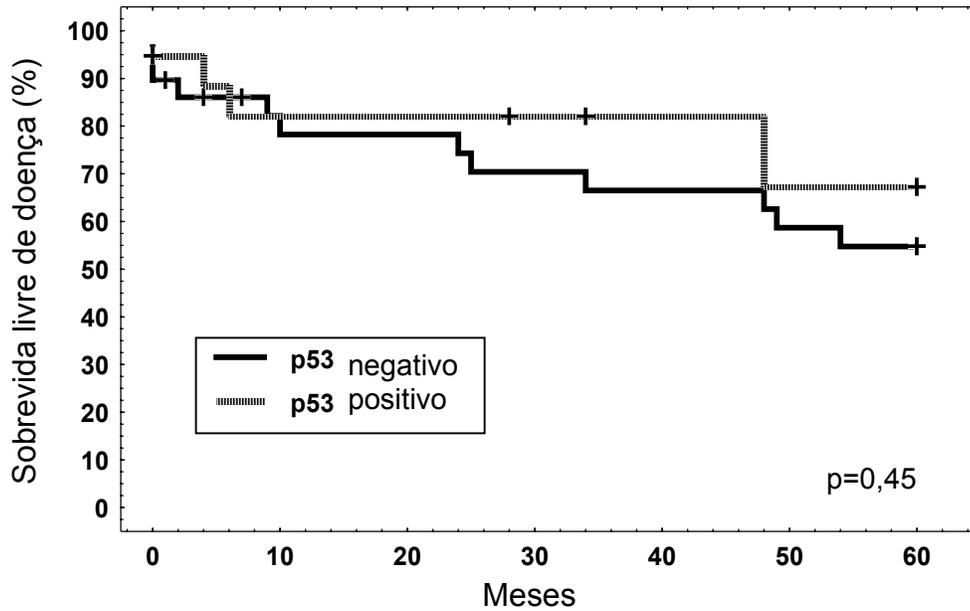


Figura 1. Sobrevida livre de doença das mulheres segundo a proteína p53, no estágio I do carcinoma de colo uterino.

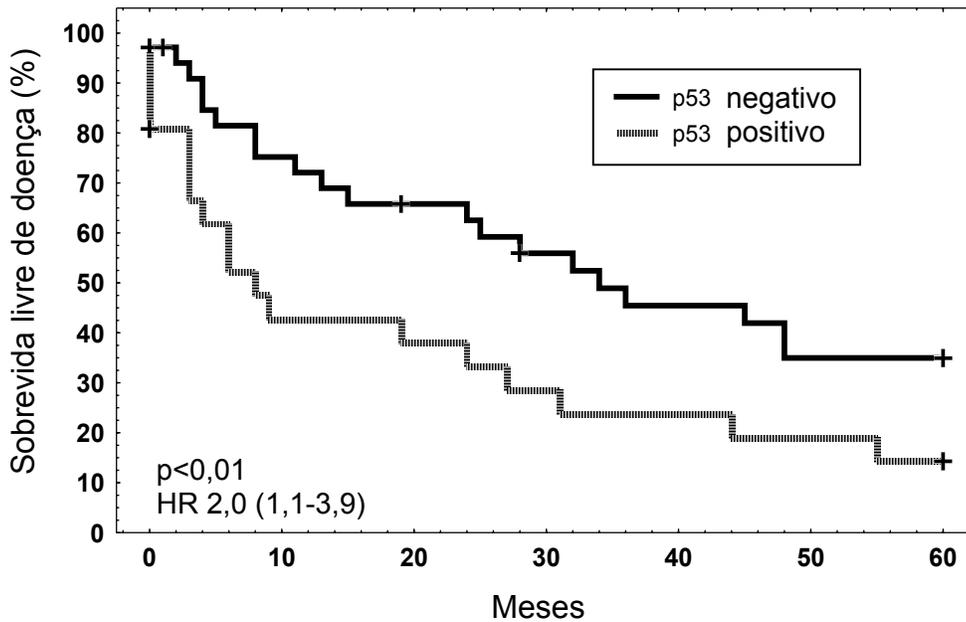


Figura 2. Sobrevida livre de doença das mulheres segundo a proteína p53, no estágio II do carcinoma de colo uterino.

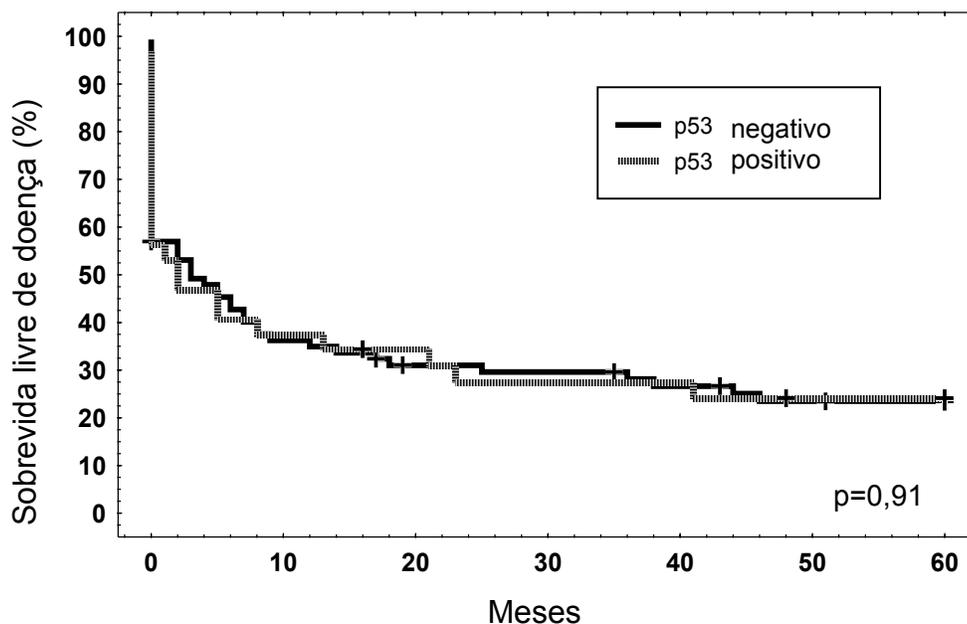


Figura 3. Sobrevida livre de doença das mulheres segundo a proteína p53, no estágio III do carcinoma de colo uterino.

O mesmo não ocorreu com relação a proteína c-myc, quando foi estudada a sobrevivida total e livre de doença estratificada por estádios clínicos (TABELA 7). As curvas de sobrevivida livre de doença no estágio II mostram-se praticamente justapostas ao longo dos 60 meses (FIGURA 5). Ainda que as curvas de sobrevivida para a proteína c-myc, nos estádios I (FIGURA 4) e III (FIGURA 6) mantiveram-se abaixo das demais mulheres, após o primeiro ano de seguimento, as diferenças não foram significantes.

TABELA 7. Sobrevida total e livre de doença de mulheres com proteína de c-myc, estratificadas por estágio do carcinoma

Variáveis	n	Sobrevida total					Sobrevida livre de doença						
		Óbitos (n)	SR (%) em meses			p ⁽¹⁾	HR (IC 95%)	Recidivas (n)	SR (%) em meses			p ⁽¹⁾	HR (IC 95%)
			12	36	60				12	36	60		
Estádio I													
c-myc													
Positivo	18	4	94	81	75	0,38	NS	9	69	63	42	0,16	NS
Negativo	30	4	97	93	84			8	86	78	70		
Estádio II													
c-myc													
Positivo	28	15	100	50	36	0,99	NS	17	54	42	28	0,77	NS
Negativo	33	18	83	60	39			22	64	32	25		
Estádio III													
c-myc													
Positivo	43	34	56	30	19	0,60	NS	35	33	23	17	0,78	NS
Negativo	68	48	57	35	27			48	38	31	28		
Total	220	123						139					

SR - taxa de sobrevivência, HR –razão de risco, IC - intervalo de confiança
 (1) teste de Wilcoxon, NS – não significante

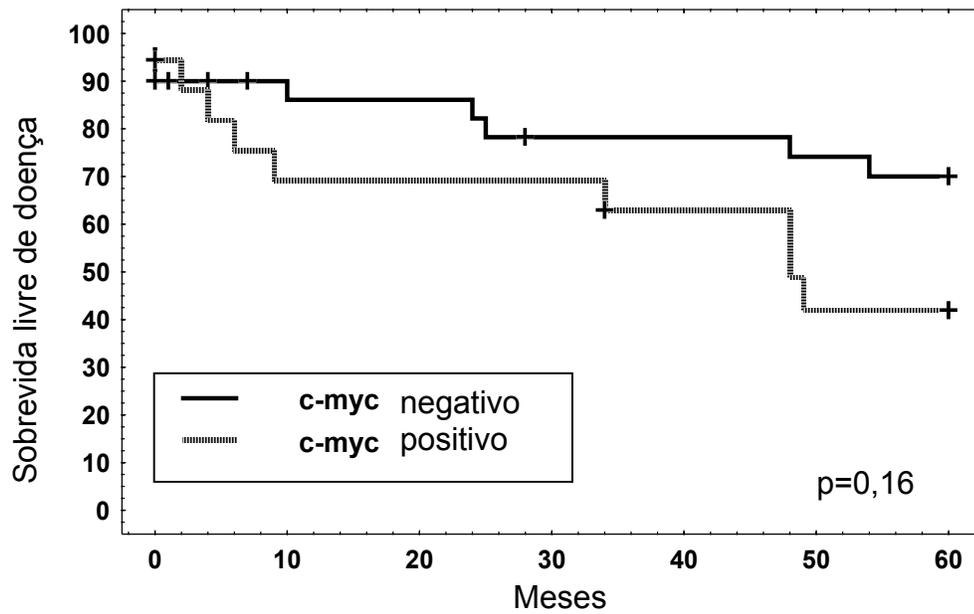


Figura 4. Sobrevida livre de doença das mulheres segundo a proteína c-myc, no estágio I do carcinoma de colo uterino.

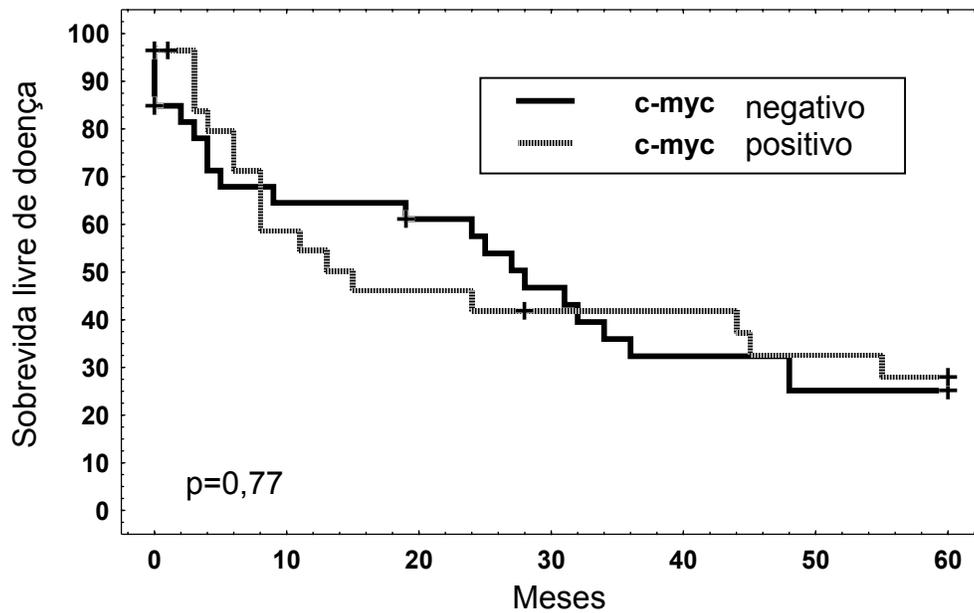


Figura 5. Sobrevida livre de doença das mulheres segundo a proteína c-myc, no estágio II do carcinoma de colo uterino.

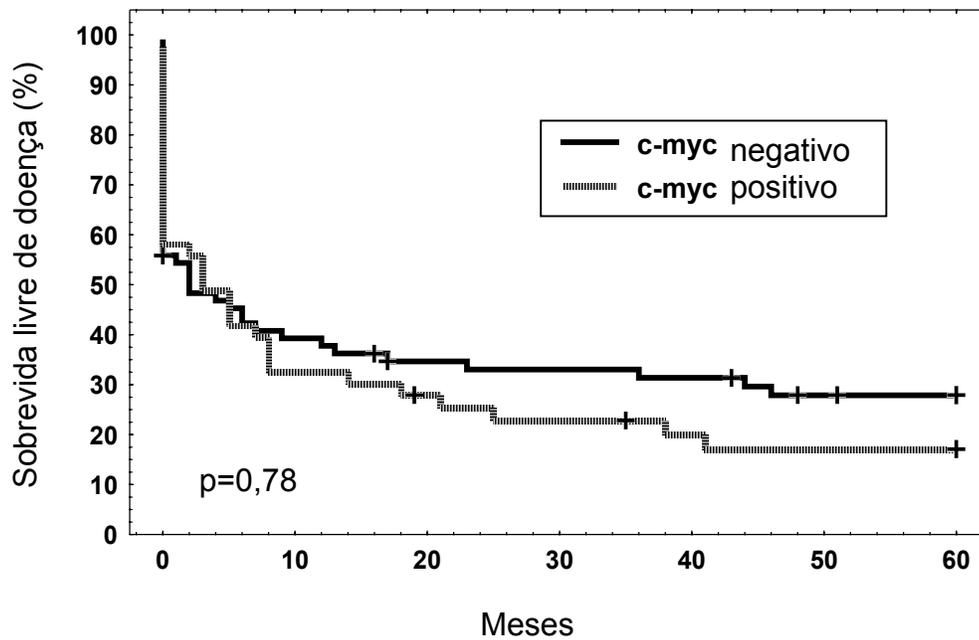


Figura 6. Sobrevida livre de doença das mulheres segundo a proteína c-myc, no estágio III do carcinoma de colo uterino.

A sobrevida total e livre de doença, bem como o risco de óbito e recidiva também foram analisados apenas em relação às 154 mulheres que tiveram controle clínico da doença pós-tratamento (CCDPT). A proteína p53 não associou-se com a sobrevida total e livre de doença nestas mulheres (TABELA 8 e FIGURA 7).

No entanto, a proteína c-myc positiva mostrou associação estatisticamente significativa ($p=0,01$) e HR para recidiva da doença 1,7 vezes maior (IC 1,1-2,6), ao final dos 60 meses, para estas mulheres (TABELA 8). As curvas de sobrevida livre de doença justapuseram-se nos primeiros meses de seguimento e depois a curva para as mulheres com proteína c-myc positiva manteve-se abaixo até os 60 meses. A diferença entre as curvas mostrou-se estatisticamente significativa ($p=0,01$). Nota-se que a recidiva ocorreu, principalmente nas mulheres com proteína c-myc positiva, nos 12 primeiros meses (FIGURA 8).

TABELA 8. Sobrevida total e livre de doença das mulheres com controle clínico da doença pós-tratamento e com proteínas p53 e c-myc

Variáveis	n	Sobrevida total					Sobrevida livre de doença						
		Óbitos (n)	SR (%) em meses			p ⁽¹⁾	HR (IC 95%)	Recidivas (n)	SR (%) em meses			p ⁽¹⁾	HR (IC 95%)
			12	36	60				12	36	60		
p53													
Positivo	50	20	94	65	58	0,65	NS	27	69	55	43	0,74	NS
Negativo	104	48	93	68	49			53	72	55	44		
c-myc													
Positivo	66	34	94	59	58	0,06	NS	41	60	47	33	0,01	1,7 (1,1-2,6)
Negativo	88	34	93	73	44			39	79	60	52		
Total	154	68						80					

SR - taxa de sobrevivência, HR – razão de risco, IC - intervalo de confiança
 (1) teste de Wilcoxon, NS – não significante

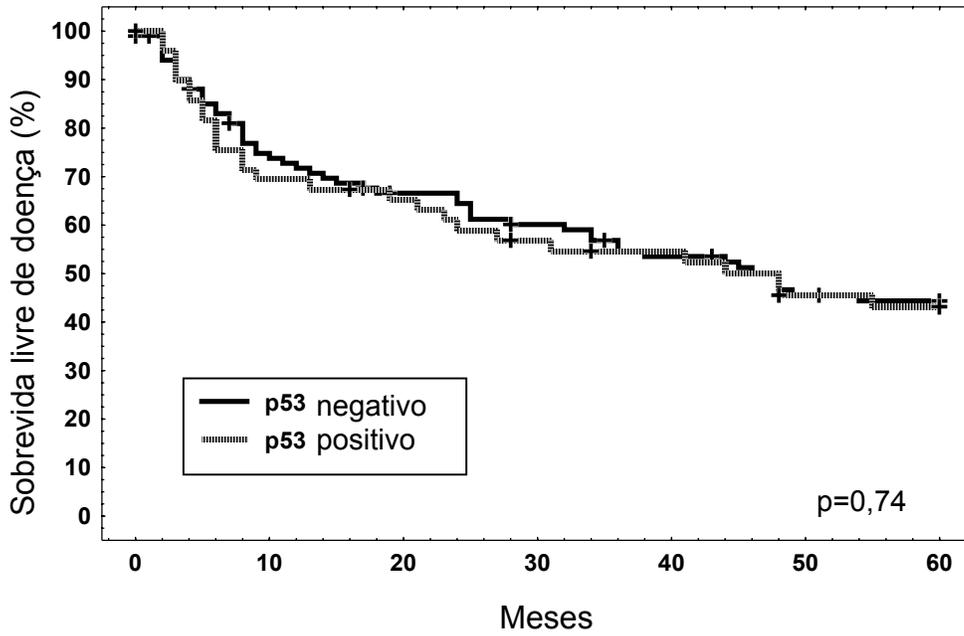


Figura 7. Sobrevida livre de doença das nas mulheres com controle clínico do carcinoma de colo uterino, segundo a proteína p53.

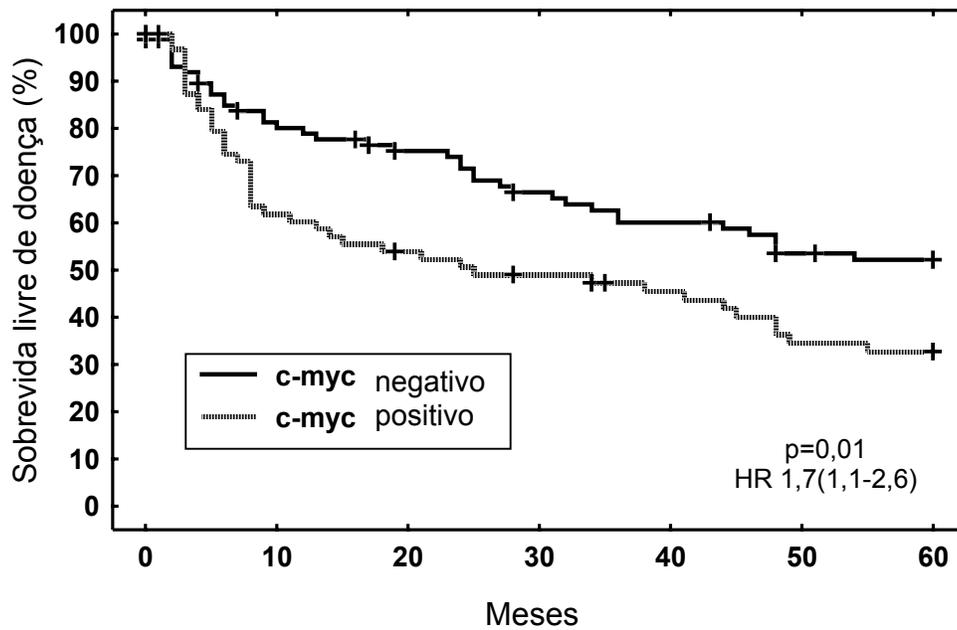


Figura 8. Sobrevida livre de doença das nas mulheres com controle clínico do carcinoma de colo uterino, segundo a proteína c-myc.

4.4. Regressão de riscos proporcionais

Por outro lado, deve-se considerar que os riscos calculados para recidiva da doença (TABELAS 6 e 8) não foram constantes durante os 60 meses. Mostrar apenas o risco de recidiva aos 60 meses seria dar uma idéia incompleta e imprecisa do que poderia ter ocorrido ao longo do tempo. Desta maneira, procedeu-se a análise de regressão de riscos proporcionais de Cox a fim de calcular o HR para recidiva, em cada período do tempo: de 0 a 12 , após 12 até 36 e após 36 meses. Esta análise mostrou HR para recidiva da doença 2,6 maior (IC 1,1-6,2), nos primeiros 12 meses ($p=0,02$), para mulheres com proteína p53 positiva e no estágio II do CEC. Também mostrou HR para recidiva 2,1 vezes maior (IC 1,1-3,9), nos primeiros 12 meses ($p=0,02$), para mulheres com proteína c-myc positiva e com CCDPT (9).

TABELA 9. Risco de recidiva em mulheres com carcinoma de colo uterino com proteínas p53 e c-myc

	Recidiva								
	De 0 a 12 meses			Após 12 até 36 meses			Após 36 meses		
	Parâmetro	HR (IC 95 %)	p	Parâmetro	HR (IC 95 %)	p	Parametro	HR (IC 95 %)	p
Estádio II									
p53									
Negativo	referência	1,0	-	referência	1,0	-	referência	1,0	-
Positivo	0,981148	2,6 (1,1-6,2)	0,02	0,420606	1,5 (0,4-5,2)	0,50	0,351729	1,4 (0,2-7,7)	0,68
CCDPT									
c-myc									
Negativo	Referência	1,0	-	Referência	1,0	-	referência	1,0	-
Positivo	0,75873	2,1(1,1-3,9)	0,02	0,027689	1,0 (0,4-2,4)	0,95	0,67187	1,9 (0,7-5,2)	0,18

HR– razão de risco

CCDPT – controle clínico da doença pós-tratamento

5. *Discussão*

De acordo com os resultados deste estudo e analisando-se globalmente, a expressão protéica do gene supressor de tumor p53 e do oncogene c-myc não associam-se ao prognóstico do carcinoma invasivo de colo uterino. No entanto, a proteína p53 associa-se ao mau prognóstico no estágio II, aumentando o risco de recidiva nos primeiros 12 meses de seguimento. De forma semelhante, a proteína c-myc associa-se ao mau prognóstico nas mulheres com controle clínico pós-tratamento, aumentando o risco de recidiva nos primeiros 12 meses de seguimento.

Os resultados que servem de base para esta resposta são as análises de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier e a de regressão de riscos proporcionais de Cox. A análise após estratificação por estágio clínico mostrou que as mulheres com carcinoma invasivo estágio II e proteína p53 positiva apresentaram menor sobrevida livre de doença e maior risco de recidiva, para os 12 primeiros meses de seguimento.

Tais resultados podem ser hipoteticamente explicados, se for considerado que o estágio I tem bom prognóstico, portanto seria necessário uma grande casuística de mulheres com carcinoma neste estágio para uma análise prognóstica mais conclusiva. Neste sentido, a avaliação em 60 meses possivelmente seria insuficiente para estudar-se a associação com fatores de risco de recidiva.

Considerando-se que as mulheres no estágio II tiveram risco 2,2 vezes maior de recidiva aos 60 meses e que o risco de recidiva devido a proteína p53 é 2,6 vezes maior neste estágio, pode-se dizer que o risco de recidiva pela proteína p53 é maior do que o risco de recidiva pelo estágio II. Isto poderia explicar a associação com o mau prognóstico nestas mulheres. Em contrapartida, no estágio III os tumores associam-se ao mau prognóstico, pois o risco de recidiva é 3,3 vezes maior aos 60 meses, o qual supera o risco de recidiva inerente a proteína p53. Pode ser que nos tumores clinicamente avançados, exista a associação desta proteína com o mau prognóstico, porém esta associação tenha sido mascarada pela própria doença.

Da mesma maneira, a análise que considerou somente aquelas mulheres que tiveram controle clínico da doença pós-tratamento, ou seja obtiveram cura clínica ou resposta clínica total ao tratamento, mostrou que a proteína c-myc tem associação prognóstica com o menor intervalo livre de doença e com o maior risco de recidiva, para os 12 primeiros meses de seguimento. Esta análise foi feita com o objetivo de excluir as mulheres que morreram durante o

tratamento, ou que, por motivos variados, não terminaram o mesmo, ou ainda aquelas que terminaram o tratamento com doença residual ou em progressão.

5.1. Expressão protéica de p53

Há alguns estudos que demonstraram associação prognóstica com carcinoma invasivo. NAKANO et al. (1996), em Osaka, Japão, analisaram 52 mulheres com CEC, entre os estádios I a IV, encontraram 82% de positividade para a proteína p53 e concluíram que o prognóstico foi pior nas mulheres com expressão positiva. Todavia, este mesmo grupo, três anos antes, publicou outro estudo com 192 mulheres no estágio III, encontraram 26% de positividade e não mostraram associação prognóstica (OKA, NAKANO, ARAI, 1993). Aparentemente, trata-se de duas populações de estudo diferentes.

TSUDA et al. (1995), em Chiba, Japão, estudaram 26 mulheres com adenocarcinoma do colo uterino, estágio I a IV e concluíram que a proteína p53 e a ausência de HPV foram indicadores de prognóstico ruim. UCHIYAMA et al. (1997), em Asahikawa, Japão, estudaram 25 mulheres com adenocarcinoma e sete com carcinoma adeno-escamoso e também encontraram que as mulheres com HPV negativo e com proteína p53 positiva tiveram pior prognóstico. O percentual de HPV positivo foi de 34% e a proteína p53 foi detectada em 34% dos tumores. Todavia, estes dois estudos não incluíram CEC.

Já se admite que a maioria dos tumores de colo uterino associam-se ao HPV (WALBOOMERS, 1999). Assim, a menor detecção de HPV observada em

muitos estudos pode ser devido à utilização de técnicas não tão precisas. Pode-se supor também que a análise para HPV tenha sido realizada em blocos arquivados em parafina, o que poderia ter dificultado a sua detecção devido a dano do DNA causado pelo processamento histológico. Portanto, os estudos com baixo percentual de detecção de HPV devem ser examinados com maior cautela.

Há vários estudos na literatura que não demonstraram o valor prognóstico da proteína p53, o que assemelha-se à análise do presente estudo quando analisou-se os resultados sem estratificação por estágio clínico. KAINZ et al. (1995), em Viena, Áustria, estudaram 109 mulheres portadoras de CEC, distribuídas respectivamente em 52, 13 e 44 nos estádios Ib, IIa e IIb, das quais 20% tinham proteína p53 positiva. HUNT et al. (1996), em Manchester, Inglaterra, estudaram 83 mulheres com CEC, adenocarcinoma e carcinoma adeno-escamoso, estádios Ib e IIa e detectaram proteína p53 em 17,1% dos casos.

Ainda, EBARA et al. (1996), em Gunma, Japão, estudaram 46 mulheres com CEC estágio IIIb, nas quais a positividade para a proteína p53 foi 63%. SKOMEDAL et al. (1999), em Oslo, Noruega, analisaram 74 mulheres com carcinoma invasor para a detecção de várias proteínas reguladoras do ciclo celular, das quais a proteína p53 foi detectada em 55% dos casos. BREMER et al. (1995), em Limberg, Holanda, analisaram 156 mulheres, sendo 116 nos estádios Ib e IIa e 40 nos estádios IIb, III e IV e a proteína p53 foi detectada em 60,9% casos. Todos estes estudos também não mostraram associação prognóstica da proteína p53.

Também existem citações na literatura sobre a associação da proteína p53 com o mau prognóstico em outros tumores ginecológicos. Demonstrou-se tal associação com o adenocarcinoma de endométrio (ROSE, 1996) e com o CEC de vulva (PILOTTI, D'AMATO, DELLA TORRE, 1995). Com relação a tumores não ginecológicos, pode-se citar que a proteína p53 associou-se ao mau prognóstico em carcinoma de bexiga (GLICK, HOWELL, DEVEREWHITE, 1996), e ao carcinoma colo-retal (HOUBIERS, VAN-DER BURG, VAN DE WATERING, 1995).

No entanto, deve-se enfatizar que detectar a expressão protéica de p53, pela técnica de imuno-histoquímica, não significa que o gene p53 esteja mutado. Inicialmente admitia-se que detectar a proteína correspondia a detectar a expressão protéica do gene mutado (BREMER et al., 1995; KAINZ et al., 1995). No entanto, esta hipótese foi mostrando-se falsa à medida que novas tecnologias para estudo de DNA tornaram-se disponíveis, ampliando o conhecimento sobre as mutações do próprio gene p53. Novos estudos foram realizados e novas hipóteses foram formuladas na tentativa de associarem-se grupos de mutações deste gene com a sua expressão protéica correspondente.

Pode-se citar alguns estudos realizados com este objetivo. Na Philadelphia, Estados Unidos, onde se estudou 21 mulheres com adenocarcinoma de colo uterino e vagina, relacionou-se a detecção da proteína p53 em 67% delas com possíveis mutações nos exons 4 a 10. No entanto não foram identificadas mutações do gene p53 em nenhum destes casos (WAGGONER et al., 1996). Em Nova York, Estados Unidos, onde se estudou

132 mulheres com CEC, adenocarcinoma e carcinoma adeno-escamoso, nos estádios Ib e IIa. A proteína p53 foi detectada em 44% casos, dos quais apenas um (1,7%) mostrou mutação no exon 8 do gene p53 (BENJAMIN et al., 1996).

Ainda, em Pavia, Itália, observaram-se 74 mulheres com adenocarcinoma, e detectou-se mutação no gene p53 com alteração dos pares de nucleotídeos, guanina: citosina para arginina: tiamina, em 13,5% dos casos, porém sem associação prognóstica, após ajustamento das variáveis confundidoras (TENTI et al., 1998). Em Oslo, Noruega, estudou-se em 19 mulheres com carcinoma de colo uterino associados a HPV, nos quais detectou-se elevada expressão da proteína p53 associada a 42% de mutações no gene p53 (HELLAND et al., 1998). Pode-se inferir que a ausência de mutações no gene significaria que a atividade supressora do gene p53 está funcionando e esta hipótese cria uma associação paradoxal com a detecção da proteína p53 pela imuno-histoquímica, o desenvolvimento do carcinoma e o seu prognóstico.

Vários pesquisadores têm se manifestado no sentido de que a detecção da expressão protéica de p53 deve ser analisada paralelamente a detecção de mutações no gene p53. Desta maneira, em 1990, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) Organização Mundial de Saúde (WHO), na França, iniciou um banco de dados de mutações somáticas do gene p53, reunindo os resultados sobre o sequenciamento dos 11 exons do gene p53. Já foram descritas mais de 8.000 mutações e 90% destas estariam no core dominante, ou seja, entre os exons 5 a 8 (IARC, 1998).

Acredita-se que exista um polimorfismo no gene p53, o qual tornaria o seu produto protéico mais susceptível a degradação pelo E6 do HPV. Este polimorfismo foi descrito no codon 72, no qual haveria troca do aminoácido prolina por arginina, que é mais susceptível a degradação. Quando foram analisados os alelos em tumores associados ao HPV, comparando-se com a população em geral, notou-se que os indivíduos portadores do gene p53 homozigoto com arginina na posição 72 tinham um risco 7 vezes maior de desenvolver infecção por HPV oncogênico (STOREY et al., 1998). Entretanto, não há informações sobre a associação deste polimorfismo com o prognóstico do CEC.

O presente estudo também analisou a associação da expressão protéica de p53 com o prognóstico, apenas aquelas mulheres que após o tratamento obtiveram controle clínico da doença, mas os resultados não mostram associação com o prognóstico. No entanto há relatos na literatura sobre o fato de alguns tumores malignos associados a detecção de proteína p53 apresentarem menor sensibilidade a radioterapia (SILES, VILLALOBOS, VALENZUELA, 1996) e a quimioterapia (NEUBAUER et al., 1996).

5.2. Expressão protéica de c-myc

Já foi descrita a associação da proteína c-myc com o mau prognóstico do carcinoma de colo uterino, mais especificamente com relação à progressão tumoral. Sabe-se que as mulheres com proteína c-myc positiva tem maior risco de recidiva e metástases à distância. Esta hipótese é compatível com o

conhecimento sobre o papel regulador do gene c-myc, pois quando está mutado, exerce a função de oncogene e permite a expansão de clones de células tumorais, como descrito anteriormente. Portanto seria esperado que a detecção da proteína c-myc estivesse associada à pior sobrevida livre de doença.

BAKER (1994) comenta que a proteína c-myc é muito susceptível à degradação e que os espécimes tissulares para análise imuno-histoquímica devem ser imediatamente fixados. Vários pesquisadores do Instituto Gustave Roussy, em Villejuif, França estudaram 93 espécimes de tecido tumoral frescos e demonstraram que a proteína c-myc associou-se à maior agressividade, menor sobrevida e maior risco de recidiva do carcinoma de colo uterino (RIOU, 1988; BOURHIS et al., 1990). Segundo RIOU et al. (1990), mesmo nas mulheres com linfonodos negativos com proteína c-myc positiva houve maior risco de recidiva da doença. SOWANI et al. (1989), no Reino Unido, acreditavam que as mulheres com proteína c-myc positiva tinham maior probabilidade de desenvolver doença extra pélvica.

Resultados mostrando mau prognóstico também repetiram-se quando foram estudados outros tumores não associados ao HPV. Pode-se citar um estudo realizado em mulheres com carcinoma de mama (ITO, YOSHIMOTO, IWASE, 1995). Também já foi descrita a associação da proteína c-myc em tumores não ginecológicos, que mostraram mau prognóstico após o tratamento, como em melanoma (LEONETTI et al., 1999), em Sarcoma de Ewing

(SOLLAZZO et al., 1999) e em carcinoma de bexiga (KUBOTA, MIYAMOTO, NOGUCHI, 1995).

No entanto, acredita-se que da mesma forma que as mutações no gene p53, aquelas no gene c-myc devem ser relacionadas com a correspondente expressão protéica. A proteína c-myc, quando codificada pelo gene normal, tem vida média de minutos e não pode ser detectada por método de imunohistoquímica (GODWIN et al, 1997). Assim, poderia ser esperado que, se o gene c-myc está mutado, a respectiva proteína possa ser detectada, no entanto parece que esta inferência nem sempre seria verdadeira.

Um estudo realizado em Oxford, Reino Unido em mulheres com CEC estádios I e II, pesquisou a proteína c-myc em 57 casos e alterações do exon 1 do gene c-myc em 40 casos. Observou-se correlação entre a detecção da proteína e mutações do gene c-myc em apenas 7,5% das mulheres (O'LEARY et al., 1997).

Por outro lado, alguns estudos não mostraram associação prognóstica da proteína c-myc com o prognóstico após o tratamento. SYMONDS et al. (1992), em Glasgow, Reino Unido, avaliaram 55 mulheres nos estádios III e IV, submetidas a quimioterapia neoadjuvante a radioterapia. Entre outros oncogenes, a proteína de c-myc foi positiva em 45% dos casos. BREWER et al. (1996) também não encontraram associação prognóstica quando estudaram 66 mulheres na Califórnia, Estados Unidos, entre os estádios Ia e IIa, tratadas cirurgicamente e alguns casos avançados, tratadas com quimioterapia

neoadjuvante e cirurgia. Entre outros oncogenes, a proteína de c-myc foi detectada em 21% de 52 mulheres. POLISCHAUK et al. (1997), em Estocolmo, Suíça, analisaram 70 mulheres com CEC estádios II e III, submetidas a radioterapia e obtiveram o mesmo resultado.

5.3. Faixa etária e tempo de atividade sexual

Com o intuito de analisar os fatores prognósticos para o carcinoma de colo uterino num contexto geral, o presente estudo considera a faixa etária da mulher e tempo de atividade sexual como variáveis de trajetória prognóstica. A frequência da proteína p53 foi maior nas mulheres mais jovens, o que pode sugerir evolução mais rápida e maior agressividade do CEC. Portanto, estas mulheres teriam prognóstico ruim (CARMICHAEL et al; 1986). No entanto há estudos que não demonstraram associação da proteína p53 com a faixa etária da mulher (TENTI et al., 1998; SAITO, HOSHIAI, NODA, 2000).

A frequência da proteína c-myc foi maior nas mulheres com menor tempo de atividade sexual. Pode-se inferir também que o tempo de atividade sexual, poderia indicar indiretamente para o período de latência e evolução do carcinoma de colo uterino (ZEFERINO, 1994). Admitindo-se que o HPV de alto risco oncogênico tenha infectado a mulher através da relação sexual, a idade ao primeiro coito poderia ser um marco do início do processo carcinogênico no epitélio cervical.

Assim, deste marco até o momento do diagnóstico, poder-se-ia estimar o período de evolução da doença, incluindo a latência e a carcinogênese. É óbvio que esta medida indireta não pode precisar a carga viral recebida pelo epitélio cervical, tampouco leva em conta outros fatores facilitadores da carcinogênese. Mas, se a mulher tem menor período de latência até o surgimento de formas clínicas do câncer, pode-se supor que a doença é mais agressiva, evolui rapidamente e também tem prognóstico ruim.

5.4. Considerações gerais

Na tentativa de explicar a grande variabilidade entre os estudos apresentados anteriormente, em relação a detecção da expressão protéica de p53 e de c-myc com o presente estudo, deve-se reportar às condições em que as análises foram realizadas. Inicialmente pode-se considerar que muitos destes estudos foram realizados com amostras de pequeno tamanho, que possivelmente não atenderiam à uma análise adequada para prognóstico. Isto é esperado em países desenvolvidos com boa cobertura para rastreamento precoce do carcinoma de colo uterino, pois o número de formas clínicas da doença é pequeno.

Além disso deve-se destacar que algumas análises incluíram mulheres com adenocarcinoma ou em carcinoma adeno-escamoso de colo uterino. Relembrando, estes tipos histológicos, em geral, são menos freqüente, tem evolução mais rápida e são mais agressivos quando comparado ao CEC (FIGO,

1998). Desta maneira, seria esperado que estas mulheres tenham mau prognóstico inerente à própria doença, o que poderia mascarar, de certa forma, o possível valor prognóstico das proteínas p53 e c-myc.

Outro ponto a ser considerado é que muitos destes estudos foram realizados em mulheres principalmente no estágio I do carcinoma de colo uterino. Com já foi dito anteriormente, a análise de fatores prognósticos também poderia ter sido mais restrita a casos com mau prognóstico, selecionados pela ações preventivas, o que dificultaria, também, demonstrar o valor prognóstico das proteínas p53 e c-myc.

O presente estudo foi desenvolvido na população feminina brasileira a qual não submete-se ao exame de Papanicolaou rotineiramente, como dito anteriormente, ou tem dificuldade de acesso aos serviços de saúde, de modo que o número de casos nos estádios III é o mais prevalente em relação aos outros estádios. Os percentuais dos estádios I, II e III foram crescentes, quase que mostrando-se tal qual a história natural da doença. Isto reflete de forma direta os programas de rastreamento para o carcinoma de colo uterino realizados na década de 80. Nesta época, estimou-se que a cobertura destes programas foi de 2% em âmbito nacional, chegando a 10% em grandes cidades como São Paulo e Rio de Janeiro (AQUINO et al., 1986).

Outro ponto relevante a ser esclarecido é sobre o tipo de fixação que o tecido tumoral foi submetido antes de ser processado pelo método de imunohistoquímica. Um estudo realizado em Kuopio, Finlândia, analisou amostras de

6 carcinomas de mama, 2 de vulva e 2 CEC de pulmão. Quando o tecido foi congelado, a detecção da proteína c-myc, foi de 50%, mas quando o tecido foi fixado em formalina a proteína c-myc foi detectada somente em 20% dos casos (TERVAHAUTA et al., 1992). No entanto deve-se ressaltar que o número de pacientes estudadas foi muito pequeno, o que poderia explicar a baixa frequência de casos detectados em tecidos fixados. O presente estudo utilizou tecido fixado em formalina e arquivado em blocos de parafina, o que poderia ter limitado a detecção da expressão das proteínas.

Também pode-se citar a variabilidade de anticorpos para imunohistoquímica disponíveis no mercado e que foram utilizados nos diferentes estudos cujos resultados foram discutidos acima. Um estudo mostrou que o anticorpo monoclonal p53-DO7 detectou mais de 50% de casos positivos da proteína p53 e esta detecção foi maior do que aquela pelo anticorpo p53-1801 (LAMBKIN et al., 1994). Tal detecção poderia ter sido prejudicada, conforme o tipo de anticorpos utilizados, o que também poderia explicar a diversidade de alguns resultados demonstrados por diferentes autores.

5.5. Considerações finais

O presente estudo não tem a pretensão de propor nenhum novo método de rastreamento das mulheres com maior risco para recidiva da doença. A rigor, ainda não há indicação de uso na prática clínica, da detecção através da imunohistoquímica das proteínas p53 e c-myc, como ocorre com a maioria do

conhecimento disponível em biologia molecular. Ainda que possamos identificar mulheres com maior risco de recidiva, através destes marcadores biológicos, as intervenções terapêuticas possíveis não representariam melhora do prognóstico. Talvez pudéssemos diminuir o intervalo de seguimento destas mulheres, enquanto aguarda-se que a terapia molecular, a nível de genes supressores e oncogenes, possa ter alguma aplicação clínica efetiva no controle do carcinoma invasivo do colo uterino.

6. *Conclusões*

- A frequência da expressão protéica de p53 e c-myc é de 35% e 40%, respectivamente.
- As mulheres mais jovens e com menor tempo de atividade sexual têm maior frequência das proteínas p53 e c-myc, respectivamente, o que sugere maior agressividade do carcinoma de colo uterino.
- A expressão protéica de p53 associa-se ao mau prognóstico nas mulheres no estágio II, aumentando o risco de recidiva nos primeiros 12 meses de seguimento.
- A expressão protéica de c-myc associa-se ao mau prognóstico nas mulheres com controle clínico da doença pós-tratamento, aumentando o risco de recidiva nos primeiros 12 meses de seguimento.

7. Summary

Some researchers studied p53 and c-myc protein expression as prognostic factor in cervical cancer, but the most of these studies were performed in developed countries, where there are more efficient screening programs and the preventive actions may select aggressive forms of disease. This study intended to determine the prognostic value of p53 and c-myc protein among Brazilian women with cervical squamous cell carcinoma. It was a cohort study, which accepted 80% power, CI 95% and admitted 220 women, from 1992 to 1994, diagnosed as FIGO stage Ib to III and followed at 5 years. The paraffin-embedded tissue was processed by immunohistochemistry for p53 (Dako D07) and c-myc (Santa Cruz Biotechnology MX 9E10). Statistical analysis used Cochran-Armitage test, Kaplan-Meier method with Wilcoxon or log-rank test and Cox's proportional hazard model. The age of women ranged from 25 to 89 years old (mean 53.4) and the carcinoma was diagnosed as 22%, 28% and 50%, on stage I, II and III respectively. There was inverse tendency between age strata and p53 protein ($p=0.03$) and between sexual intercourse interval and c-myc

protein ($p=0.03$) The p53 protein was detected in 35% of women and c-myc in 40% of them. There was shorter disease free survival in women in stage II of disease with p53 protein ($p<0.01$) and higher risk of relapse HR 2.6 (CI 1.1-6.2) among 0 to 12 months ($p=0.02$). There was shorter disease free survival in women after clinical outcome with c-myc protein ($p<0.01$) and higher risk of relapse HR 2.1 (CI 1.1-3.9) among 0 to 12 months ($p=0.02$). Protein expression of p53 is associated with poor prognosis only in stage II and protein expression of c-myc is associated only after clinical outcome.

8. Referências Bibliográficas

- AQUINO, E.M.L.; CARVAKHO, A.I.; FAERSTEIN, E.; RIBEIRO, D.C.S. - Situação atual da detecção precoce do câncer cérvico-uterino no Brasil. **Cad. S. Publ.**, 2:53-65, 1986.
- BAKER, V.V. - Oncogene expression in cervical cancer. In: ROTEHENBERG, M.L. - **Gynecologic oncology: controversies and new developments**. Boston, Kluwer Academic Publisher, 1994. p.43-51.
- BENJAMIN I., SAIGO P., FINSTAD C., TAKAHASHI H., FREDERICI M., RUBIN S., BOYD J. - Expression and mutational analysis of p53 in stage IB and IIA cervical cancers. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 175:1266-71, 1996.
- BOURHIS J., LE.M.G., BARROIS M., GERBAULET A., JEANNEL D., DUVILLARD P., LE DOUSSAL V., CHASSAGNE D., RIOU G. - Prognostic value of c-myc protooncogene overexpression in early invasive carcinoma of the cervix. **J. Clin. Oncol.**, 8:1789-96, 1990.
- BREMER, G.L.; TIEBBOSCCHB, A.T.M.G.; PUTTEN, H.W.H.; HAAN, J.; ARENDS, J.W. - P53 tumor suppressor gene protein expression in cervical cancer: relationship to prognosis. **Eur. J. Gynecol. Reprod. Biol.**, 63:55-9, 1995.

- BRENNA, S.M.F. - **Conhecimento, atitude e prática do exame de papanicolaou em mulheres com neoplasia cervical**. Campinas, 1996 [Tese - Mestrado – Universidade Estadual de Campinas].
- BREWER, C.A.; LIAO, S.Y.; WILCZYNSKI, S.P.; PASTOREKOVA, S.; PASTOREX, J.; ZAVADA, J.; KUROSAKI, T.; MANETTA, A.; BERMAN, M.L.; DiSAIA, P.J.; STANBRIDGE, E.J. - A study of biomarkers in cervical carcinoma and clinical correlation of the novel biomarker MN. **Gynecol. Oncol.**, **63**:337-44, 1996.
- CANNIZZARO, L.A.; DURST, M.; MENDEZ, M.J.; HECHT, B.K.; HECHT, F. - Regional chromosome localization of human papillomavirus integration sites near fragile sites, oncogenes and cancer chromosome breakpoints. **Cancer Genet. Cytogenet.**, **33**:93-8, 1988.
- CARMICHAEL, J.A.; CLARKE, D.H.; MOHER, D.; OHLKE, I.D.; KARCHMAR, J. - Cervical carcinoma in women aged 34 and younger. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **154**:264-9, 1986.
- CHO K.R. Cervical cancer. In: VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K.W. - **The genetic basis of human cancer**. New York: McGraw-Hill, 2th ed., 1998. p.631-7.
- CORY, S.; VAUX, D.L.; STRASSER, A.; HARRIS, A.W.; ADAMS, J.M. - Insights from bcl-2 and myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. **Cancer Res.**, **59**:1685-92, 1999.
- CORTNER, J. & WOUDE, G.F.V. - Essentials of molecular biology. In: In: DEVITA Jr, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, SA. - **Cancer: principles & practice of oncology**. 5thed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997. p.121-33.

- COX, D.R. - Regression models and life tables. *J R Stat. Soc.*, **34**:187-220, 1972.
- DISAIA, P.J. & CREASMAN, W.T. - Genes and Cancer. In: DISAIA, P.J. & CREASMAN, W.T. - **Clinical gynecologic oncology**. 5thed. St. Louis, Mosby Year Book, 1997. p.576-92.
- EBARA, T.; MITSUHASHI, N.; SAITO, Y.; SAKURAI, H.; HASEGAWA, M.; TAKAHASHI, M.; TAKAHASHI, T.; HAYAKAWA, K.; NIIBE, H. Prognostic significance of immunohistochemically detected p53 protein expression in stage IIIb squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation therapy alone. *Gynecol. Oncol.*, **63**:216-8, 1996.
- EVERITT, B.S. **The analysis of contingency tables**. 2^a ed. New York, Chapman & Hall, 1992. 67p.
- FEARON, E.R. - Oncogenes and tumor supressor genes. IN: ABELOFF, M.D.; ARMITAGE, J.O.; LICHTER, A.S.; NIEDECHUBER, J.E. - **Clinical oncology**. New York, Churchill Livingstone, 1995. p.11-28.
- FIGO ANNUAL REPORT ON THE RESULTS OF TREATMENT IN GYNAECOLOGICAL CANCER. Milano, FIGO, 1998. 34p. (*J. Epidemiol. Biostat.*, **23**)
- FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W.; WAGNER, E.H. - Prognóstico. In: FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W.; WAGNER, E.H. - **Epidemiologia clínica**. 3^a ed. Porto Alegre, Artes Médicas, 1996. 281p.
- FRANCO, E.L. - The sexually-transmitted disease model for cervical cancer: incoherent epidemiologic findings and role of misclassification of human papillomavirus infection. *Epidemiology* **2**:98-106, 1991.

- GLICK, S.H.; HOWELL, L.P.; DEVEREWHITE, R.W. - Relationship of p53 and bcl-2 to prognosis in muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. **J. Urol.**, **155**:1754-7, 1996.
- GODWIN, A.K.; SCHULTZ, D.C.; HAMILTON, T.C.; KNUDSON JR., A.G. - Oncogenes and tumor suppressor genes. In: HOSKINS, W.J.; PEREZ, C.A.; YOUNG, R.C. - **Principles and practice of gynecology oncology**. 2thed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997. p.107-48.
- GOMPEL C. & KOSS L.G. - Princípios de biologia molecular - As funções celulares. In: GOMPEL C. & KOSS L.G. - **Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas**. São Paulo: Manole Ltda., 1997. p.13-21.
- HELLAND, A.; KARLSEN, F.; DUE, E.U.; HOLM, R.; KRISTENSEN, G.; BORRESEN-DALE, A.L. - Mutations in the TP53 gene and protein expression of p53, MDM2 and p21/WAF-1 in primary cervical carcinomas with no or low human papillomavirus load. **Br. J. Cancer**, **78**:69-72, 1998.
- HOUBIERS, J.G.A.; VAN-DER-BURG, S.H.; VAN DE WATERING, L.M.G. - Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer. **Br. J. Cancer**, **72**:637-41, 1995.
- HUNT C.R., HALE R.J., BUCKLEY C.H., HUNT J. - P53 Expression in carcinoma of the cervix. **J. Clin. Pathol.**, **49**:971-4, 1996.
- IARC DATABASE OF P53 GENE MUTATIONS IN HUMAN TUMORS AND CELL LINES: UPDATED COOMPILATION, REVISED FORMATS AND NEW VISUALIZATION TOOLS. (online). ed. 1. Lyon, France, 1998 (cited 24th December 1999). Available from Internet: <http://www.iarc.fr>.

- ITO, I.; YOSHIMOTO, M.; IWASE, T.- Association of genetic alterations in chromosome 17 loss of hormone receptors in breast cancer. **Br. J. Cancer**, **71**:438-41, 1995.
- KAINZ, Ch; KOHLBERGER, P.; GITSCH, G.; SLIUTZ, G.; BREITENECKER, G.; REINTHALLER, A. Mutant p53 in patients with invasive cervical cancer stages Ib to IIb. **Gynecol. Oncol.**, **57**:212-4, 1995.
- KAPLAN, E.L. & MEIER, P. Non-parametric estimation from incomplete observation. **J. Am. Stat. Assoc.**, **4**:57-81, 1958.
- KASTAN, M.B. - Molecular biology of cancer: the cell cycle. In: DeVITA JR, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. - **Cancer: principles & practice of oncology**. 5thed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997. p.121-33.
- KRETZNER, L.; BLACKWOOD, E.M.; EISENMAN, R.N. - Myc and Max proteins possess distinct transcriptional activities. **Nature**, **359**:426-8, 1992.
- KUBOTA, Y.; MIYAMOTO, H.; NOGUCHI, S. The loss of retinoblastoma gene in association with c-myc and transforming growth factor-B1 gene expression in human bladder cancer. **J. Urol.**, **154**:371-4, 1995.
- LANE, D. P. - P53, guardian of genome. **Nature**, **358**:15-6, 1992.
- LAMBKIN, H.A., MOTHERSIL, C.M.; KELEHAN, P. - Variations in immunohistochemical detection of p53 protein overexpression in cervical carcinomas with different antibodies and methods of detection. **J. Pathol.**, **172**:13-8, 1994.
- LEE, R.T. - **Statistical methods for survival data analysis**. California, Lifetimes Learning Publications Belmont, 1980, 557p.

- LEONETTI, C.; BIROCCIO, A.; CANDILORO, A.; CITRO, G.; FORNARI, C.; MOTTOLESE, M.; DEL BUFALO, D.; ZUPI, G. - Increase of cisplatin sensitivity by c-myc antisense oligodeoxynucleotides in a human metastatic melanoma inherently resistant to cisplatin. **Clin. Cancer**, **5**:2588-95, 1999.
- MACLEAN, C.D. - Principles of cancer screening. **Med. Clin. North Am.**, **80**:1-14, 1996.
- NAKANO, T.; OKA, K.; TANIGUCHI, N. - Manganese superoxide dismutase expression correlate with p53 status and local recurrence of cervical carcinoma treated with radiation therapy. **Cancer Res.**, **56**:2771-5, 1996.
- NEUBAUER, A.; THIEDE, C.; HUHN, D.; WITTING, B. P53 and induction of apoptosis as a target for anticancer therapy. **Leukemia**, **10**:S2-S4, 1996.
- OKA, K.; NAKANO, T.; ARAI, T. - P53 CM1 expression is not associated with prognosis in uterine cervical carcinoma. **Cancer**, **72**:160-4, 1993.
- O'LEARY, J.J.; LANDERS, R.J.; CROWLEY, M.; HEALY, I.; KEALY, W.F.; HOGAN, J.; DOYLE, C.T. - Alterations in exon 1 of c-myc and expression of p62 c-myc in cervical squamous cell carcinoma. **J. Clin. Pathol.**, **50**:896-903, 1997.
- PILOTTI, S.; D'AMATO, L.; DELLA TORRE, G. - Papillomavirus, p53 alteration and primary carcinoma of the vulva. **Diag. Mol. Pathol.**, **4**:239-48, 1995.
- POESCHLA, E.M. & WONG-STAAAL, F. - Etiology of cancer: viruses. In: De VITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: principles & practice of oncology**. 5thed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997. 651p.

- POLISCHOUK, A.G.; SCOTNIKOVA, O.I.; SERGEEVA, N.S.; ZHARINOV, G.M.; LEWENSOHN, R.; ZHIVOTOVSKY, B. - Response to radiotherapy of human uterine cervix carcinoma is not correlated with rearrangements of the Ha-ras or c-myc genes. *Eur. J. Cancer*, **33**:942-9, 1997.
- RIOU, G. - Proto-oncogene and prognosis in early carcinoma of the uterine cervix. *Cancer, Surv.*, **7**:441-556, 1988.
- RIOU, G.; BOURHIS, J.; LE, M.G.- The c-myc proto-oncogene in invasive carcinomas of the uterine cervix. Clinical relevance of overexpression in early stages of the cancer. *Anticancer Res.*, **10**:1225:32, 1990.
- ROSE, P.G. - Endometrial carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, **335**:640-8, 1996.
- ROWLEY, J.D. - A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia. *Nature*, **243**:290-5, 1973.
- SAITO, J.; HOSHIAI H., NODA K. - Type of human papillomavirus and expression of p53 in elderly women with cervical cancer. *Gynecol. Obstet. Invest.*, **49**:190-3, 2000.
- SCHMIDT, E.V. - The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene*, **18**:2988-96, 1999.
- SILES, E.; VILLALOBOS, M.; VALENZUELA, M.T. - Relationship between p53 status and radiosensitivity in human tumour cell lines. *Br. J. Cancer*, **73**:581-8, 1996.
- SINGER A. & MONAGHAN J.M. - Human papillomaviruses in pathogenesis of lower genital tract neoplasia. In: SINGER A. & MONAGHAN J.M. - **Lower genital tract precancer**. 2th ed., Blackwell Science, 1999. p.15-33.

- SKILLING J.S. & SOOD A.K. - Molecular genetics: implications for the practicing gynecologic oncologist. *CME J. Gynecol. Oncol.*, 2:6-15, 1997.
- SKOMEDAL, H.; KRISTENSEN, G.B.; LIE, A.K.; HOLM, R. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, Rb and EGFR in cervical carcinomas. *Gynecol. Oncol.*, 73:223-8, 1999.
- SOLLAZZO, M.R.; BENASSI, M.S.; MAGAGNOLI, G.; GAMBERI, G.; MOLENDINI, L.; RAGAZZINI, P.; MERLI, M.; FERRARI, C.; BALLADELLI, A.; PICCI, P. Increased c-myc oncogene expression in Ewing's sarcoma: correlation with Ki67 proliferation index. *Tumori*, 85:167-73, 1999.
- SOWANI, A.; ONG, G.; DISCHE, S.; QUINN, C.; WHITE, J.; SOUTTER, P.; WASMAN, J.; SIKORA, K. - C-myc oncogene expression and clinical outcome in carcinoma of the cervix. *Mol Cell Probes*, 3:117-21, 1989.
- STAGLE, B.L.; KAUFMAN, R.H.; REEVES, W.C.; ICENOGLE, J.P. Expression of ras, c-myc and p53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 83:1401-8, 1998.
- STOREY, A.; THOMAS, M.; KALITA, A.; HARWWOD, C.; GADIOL D.; MANTOVANI, F.; BREUER, J.; LEIGH, I.M.; MATLASHEWSKI, G.; BANKS, L. - Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*, 393:229-34, 1998.
- SYMONDS, R.P.; HABESHAW, T.; PAUL, J.; KERR, D.J.; DARLING, A.; BURNETT, R.A.; SOTSIU, F.; LINARDOPOULOS, S.; SPANDIDOS, D.A. - No correlation between ras, c-myc and c-jun proto-oncogene expression and prognosis in advanced carcinoma of cervix. *Eur. J. Cancer*, 28:1615-7, 1992.

SYRJÄNEN, K.J.& SYRJÄNEN, S.M. - Molecular biology of papillomaviruses. In:
SYRJÄNEN, K.J.& SYRJÄNEN, S.M. - **Papillomavirus infections in
human pathology**. Chichester, John Wiley & sons, Ltd, 2000, 615 p.

TAYLOR, C.R.; SHI, S.R.; COTE, R.J. - Antigen retrieval for
immunohistochemistry. *Appl. Immunohist.*, **4**:144-66, 1996.

TENTI, P.; PAVANELLO, S.; PADOVAN, L.; SPINILLO, A.; VESENTINI, N.;
ZAPPATORE, R.; MIGLIORA, P.; ZARA, C.; RANZANI, G.N.; CARNEVALI,
L. - Analysis and clinical implications of p53 gene mutations and human
papillomavirus type 16 and 18 infection in primary adenocarcinoma of the
uterine cervix. *Am. J. Pathol.*, **152**:1057-63, 1998.

TERVAHAUTA, A.L.; SIRJANEN, S.M.; KALLIO, P.J.; SYRJANEN, K.J. -
Immunohistochemistry, in situ hybridization and polymerase chain reaction
(PCR) in detecting c-myc expression in human malignancies. *Anticancer
Res.*, **12**:1005-11, 1992.

TSUDA, H.; JIKO, K.; TSUGANE, S.; YAJIMA, M.; YAMADA, T.; TANEMURA, K.;
TSUNEMATSU, R.; OHMI, K.; SONODA, T.; HIROHASHI, S. - Prognostic
value of p53 protein accumulation in cancer cell nuclei in adenocarcinoma
of the uterine cervix. *JPN J. Cancer*, **86**:1049-53, 1995.

UCHIYAMA, M.; IWASAKA, T.; MATSUO, N.; HACHISUGA, T.; MORI, M.;
SUGIMORI, H. - Correlation between human papillomavirus positivity and
p53 gene overexpression in adenocarcinoma of the uterine cervix.
Gynecol. Oncol., **65**:23-9, 1997.

ZEFERINO, L. C. **Influência da idade ao início da atividade sexual e do
número de parceiros sexuais da mulher na história natural da
neoplasia de colo uterino**. Campinas, 1994 [Tese - Doutorado –
Universidade Estadual de Campinas].

WAGGONER, S.E.; ANDERSON, S.M.; LUCE, M.C.; TAKAHASHI, H.; BOYD, J. -
p53 protein expression and gene analysis in clear cell adenocarcinoma of the
vagina and cervix. ***Gynecol. Oncol.***, **60**:337-8, 1996.

WALBOOMERS, J.M.; JACOBS, M.V.; MANOS, M.M.; BOSH, F.X.; KUMMER,
J.A.; SHAH, K.V.; SNIJDERS, P.J.; PETO, J.; MEIJER, C.J.; MUNOZ, N. -
Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer
world wide. ***J. Pathol.***, **189**:12-9, 1999.

9. Bibliografias de Normatizações

1. HERANI, M.L.G. – Normas para apresentação de dissertações e teses. BIREME, São Paulo, 1991. 45p.
2. Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – OF. CIR/PRP/06/95 – Normas ABNT. 1995. 8p.

4 - Recidiva/metástase

- a) Data |_|_|_|_|_| mês/ano
b) Dados clínicos:
 |_2_| recidiva local
 |_3_| metástase pélvica
 |_4_| metástase à distância

5 - Óbito

- a) Data |_|_|_|_|_| mês/ano
b) Dados: |_4_| morte por outras causas
 |_5_| morte pela doença

6 – Abandono - data da última consulta no serviço

- a) Data |_|_|_|_|_| mês/ano

7 - Dados ao 5º ano de seguimento

- a) Dados clínicos:
 |_1_| sem evidência de doença
 |_2_| recidiva local
 |_3_| metástase pélvica
 |_4_| metástase à distância
 |_5_| morte
 |_6_| abandonou o seguimento

8- Sobrevida

- a) Livre de doença: |_|_| meses
b) Total: |_|_| meses

Seção II – Ficha laboratorial

Nº |_|_|_|_|

1- Confirmação do diagnóstico histológico

Diagnóstico histológico:.....

Grau de diferenciação celular: G1 |_| G2 |_| G3 |_|
Invasão vascular |_1_| sim |_2_| não
Invasão linfáticos |_1_| sim |_2_| não

2- Diagnósticos associados

p53: |_1_| presente
 |_2_| ausente
c-myc: |_1_| presente
 |_2_| ausente

Obs:.....
.....

ANEXO 2 – BANCO DE DADOS

Nº	EST.	DIAGNÓSTICO			TRATAMENTO				RECIDIVA/METÁSTASE/ TUMOR RESIDUAL			ABANDONO	ÓBITO POR DOENÇA		SOBREVIDA EM 5 ANOS			P53	C-MYC	
		DATA	IDADE	TAS	TIPO	RT	DATA	RESP.	(1) recidiva (0) censura	DATA	DADO	TRAT	DATA	(1)óbito (0)censura	DATA	DADO	SLD			ST
1	1b	Mar-92	38	24	2	.	.	.	0	.	.	.	Mar-92	0	.	6	0	0	3+	1+
2	1b	Fev-92	40	25	1a	.	Abr-92	1	0	0	.	1	60	60	0	1+
3	2b	Mai-92	49	31	1e	.	Abr-93	1	0	.	.	.	Ago-95	0	.	6	28	40	0	3+
4	3a	Jan-92	67	35	1e	.	Fev-92	1	0	0	.	1	60	60	0	0
5	2b	Abr-92	33	20	1e	.	Nov-92	4	1	Nov-92	4	2	.	1	Out-93	5	4	18	0	0
6	2b	Mai-92	57	39	1e	.	Mar-93	1	0	.	.	.	Mar-93	0	.	6	0	12	0	3+
7	2a	Jun-92	54	18	1b	.	Nov-92	1	0	0	.	1	60	60	0	1+
8	2b	Fev-92	64	47	1e	.	Abr-92	1	0	0	.	1	60	60	0	0
9	2a	Out-92	35	17	1b	.	Mar-93	2	1	Mar-93	2	1	.	0	.	1	0	60	2+	0
10	2a	Dez-92	34	18	1b	.	Fev-93	1	0	0	.	1	60	60	0	0
11	2b	Mar-92	75	58	1b	.	Mai-92	1	1	Mar-95	4	.	.	1	Jul-95	5	34	40	0	0
12	3b	Mai-92	58	40	1e	.	Mar-93	4	1	Mar-93	4	2	.	1	Jul-93	5	0	14	0	0
13	1b	Mai-92	42	22	1a	.	Ago-92	1	1	Set-96	4	1	.	0	.	1	49	60	0	2+
14	3b	Ago-92	67	51	1e	.	Ago-92	4	1	Fev-92	4	.	.	1	Ago-92	5	0	0	0	1+
15	1b	Jun-92	60	40	1b	.	Set-92	1	0	0	.	1	60	60	0	0
16	1b	Set-92	35	20	1a	.	Set-92	1	1	Mar-97	3	2	.	0	.	3	54	60	0	0
17	3b	Nov-92	47	31	1e	.	Jul-93	1	1	Mar-94	3	2	.	0	.	1	8	60	3+	1+
18	3b	Mai-92	68	52	1e	.	Jun-93	1	0	0	.	1	60	60	3+	0
19	1b	Fev-92	74	47	1e	.	Mar-93	1	0	.	.	.	Out-93	0	.	6	7	20	0	0
20	3b	Jan-92	59	45	1e	.	Mai-92	1	1	Abr-94	3	.	.	1	Jun-94	5	23	29	2+	0
21	1b	Jan-92	44	31	1e	.	Ago-92	1	1	Out-92	3	2	.	1	Fev-93	5	2	13	0	1+
22	2b	Jan-92	37	18	1e	.	Abr-92	1	1	Abr-94	4	2	.	0	.	1	27	60	1+	0
23	3b	Jan-92	74	40	1e	.	Mai-92	1	0	.	.	.	Nov-95	0	.	6	43	47	0	0
24	3b	Jan-92	25	11	1e	.	Fev-92	3	1	Fev-92	3	.	.	1	Mai-92	5	0	4	0	0
25	2b	Jan-92	38	22	1e	.	Mai-92	1	1	Mai-94	4	.	.	1	Mai-94	5	24	28	2+	1+
26	2b	Jan-92	32	16	1e	.	Mai-92	1	0	0	.	1	60	60	0	0

27	3b	Fev-92	60	46	1e	.	Fev-93	1	1	Nov-94	4	.	.	1	Nov-94	5	21	33	1+	1+
28	3b	Fev-92	42	27	1d	.	Mar-93	1	1	Abr-94	3	.	.	1	Abr-94	5	13	26	1+	0
29	3b	Fev-92	61	45	2	.	.	.	1	Fev-92	3	.	.	1	Fev-92	5	0	0	0	1+
30	1b	Jan-92	57	41	1a	.	Fev-92	1	0	0	.	1	60	60	0	0
31	3b	Fev-92	42	25	1e	.	Jul-92	1	0	0	.	1	60	60	3+	0
32	3b	Mar-92	43	25	1e	.	Mar-92	3	1	Mar-92	3	.	.	1	Set-92	5	0	6	0	0
33	3b	Fev-92	65	48	1e	.	Mar-93	1	1	Mai-93	3	2	.	1	Dez-93	5	2	34	0	0
34	2b	Abr-92	56	40	1e	.	Dez-92	1	0	0	.	1	60	60	0	1+
35	3b	Abr-92	64	42	1e	.	Jul-92	4	1	Jul-92	4	.	.	1	Out-92	5	0	3	1+	0
36	1b	Mar-92	43	27	1a	.	Abr-92	1	1	Abr-96	4	2	.	0	.	1	48	60	0	1+
37	3b	Mai-92	68	40	1e	.	Jul-92	1	1	Nov-92	3	.	.	1	Fev-93	5	4	9	0	0
38	2b	Mai-92	41	21	1e	.	Jan-93	1	1	Abr-93	2	2	.	1	Out-93	5	3	17	1+	1+
39	3b	Mai-92	60	43	1e	.	Mar-93	3	1	Mar-93	3	.	.	1	Mar-93	5	0	10	1+	0
40	3b	Jun-92	62	43	1e	.	Dez-92	1	1	Dez-93	3	.	.	1	Dez-93	5	12	18	0	0
41	2b	Jun-92	64	35	1e	.	Dez-92	1	0	0	.	1	60	60	0	1+
42	3b	Jun-92	68	53	1e	.	Nov-92	1	0	.	.	.	Nov-92	0	.	6	0	5	0	0
43	3b	Mai-92	65	44	1e	.	Out-92	1	1	Mar-93	2	2	.	1	Nov-93	5	5	18	1+	0
44	3b	Jul-92	42	25	2	.	.	.	1	Jul-92	.	.	Jul-92	1	Jul-92	5	0	0	0	0
45	3b	Jul-92	72	57	1e	.	Nov-92	1	1	Mai-93	3	.	.	1	Mai-93	5	7	10	0	0
46	2a	Mai-92	58	43	1b	.	Nov-92	5	0	.	.	.	Nov-92	0	.	6	0	6	2+	0
47	1b	Abr-92	48	30	1a	.	Ago-92	5	0	.	.	.	Ago-92	0	.	6	0	4	1+	0
48	1b	Jun-92	36	24	1a	.	Ago-92	1	0	0	.	1	60	60	0	0
49	2b	Ago-92	47	31	1d	.	Fev-93	1	1	Mai-93	2	.	.	1	Dez-93	5	3	16	1+	1+
50	3a	Ago-92	74	57	1e	.	Jun-93	1	0	0	.	1	60	60	0	1+
51	3b	Set-92	67	53	2	.	.	.	1	Set-92	.	.	.	1	Set-92	5	0	0	1+	0
52	1b	Set-92	63	37	1e	.	Dez-92	3	1	Dez-92	3	.	.	1	Dez-92	5	0	3	0	0
53	3b	Set-92	38	22	1e	.	Fev-93	2	1	Fev-93	2	2	.	1	Out-93	5	0	13	0	0
54	1b	Ago-92	49	31	1a	.	Set-92	1	1	Set-96	4	2	.	0	.	1	48	60	1+	0
55	3b	Out-92	67	50	2	.	.	.	1	Out-92	3	.	.	1	Out-93	5	0	0	0	1+
56	2a	Nov-92	58	45	1e	.	Dez-92	1	1	Jul-95	2	1	.	0	.	1	31	60	1+	0
57	2b	Out-92	48	31	1e	.	Abr-93	3	1	Abr-93	3	2	.	1	Set-93	5	0	11	1+	0
58	3b	Nov-92	54	38	1e	.	Ago-93	4	1	Ago-93	4	.	.	1	Set-93	5	0	10	1+	1+
59	2b	Jun-92	48	25	1e	.	Dez-92	1	1	Jun-93	3	2	.	1	Ago-93	5	6	14	1+	2+

60	3b	Dez-92	49	34	1d	.	Fev-93	1	1	Mai-93	3	.	.	1	Set-93	5	3	9	0	1+
61	3b	Dez-92	36	20	2	.	.	.	1	Dez-92	3	.	.	1	Dez-92	5	0	0	0	1+
62	3b	Dez-92	56	39	1e	.	Out-93	1	1	Ago-97	3	.	.	1	Ago-97	5	46	56	0	0
63	2b	Jun-92	61	47	1b	.	Jan-95	1	1	Mai-95	3	.	.	1	Out-95	5	4	40	0	0
64	2b	Set-92	56	32	1e	.	Jun-93	1	1	Set-93	3	2	.	1	Dez-93	5	3	15	0	1+
65	2b	Mai-93	39	19	1b	.	Ago-93	1	1	Abr-94	2	.	.	1	Dez-94	5	8	19	1+	2+
66	2b	Jan-93	58	43	1e	1	Mai-93	1	0	0	.	1	60	60	0	0
67	1b	Dez-92	30	16	1b	.	Jan-93	1	1	Mai-93	4	2	.	1	Nov-93	5	4	11	1+	1+
68	3b	Jan-93	60	44	2	.	.	.	1	Jan-93	3	.	.	1	Jan-93	5	0	0	0	0
69	3b	Jan-93	82	65	1e	2	Jun-93	3	1	Jun-93	3	.	.	1	Jun-93	5	0	5	0	1+
70	2b	Jan-93	71	59	1e	1	Ago-93	1	1	Abr-96	3	.	.	1	Abr-96	5	32	39	0	0
71	3b	Abr-93	53	37	1e	1	Set-93	1	0	0	.	1	60	60	0	1+
72	3b	Fev-93	78	62	1e	1	Jun-93	1	0	0	.	1	60	60	0	0
73	2b	Fev-93	42	25	1e	1	Jun-93	1	1	Jul-94	2	2	.	1	Jan-95	5	13	23	0	1+
74	3b	Jan-93	73	43	2	.	.	.	1	Jan-93	3	.	.	1	Jan-93	5	0	0	0	2+
75	3b	Fev-93	35	18	1e	1	Jun-93	2	1	Jun-93	2	2	.	1	Dez-97	5	0	58	0	0
76	1b	Jul-93	40	21	1a	.	Ago-93	1	0	0	.	1	60	60	0	0
77	2b	Ago-93	40	25	1e	1	Mar-94	1	1	Set-94	3	.	.	1	Set-94	5	6	13	1+	2+
78	3b	Mar-93	58	42	1d	.	Jun-93	5	1	Jun-93	4	.	.	1	Jun-93	5	0	3	0	0
79	3b	Mar-93	43	25	2	.	.	.	1	Mar-93	3	.	.	1	Mar-93	5	0	0	0	0
80	2b	Mar-93	60	40	1e	1	Ago-93	1	0	0	.	1	60	60	0	0
81	1b	Mar-93	34	17	1a	.	Mar-93	1	0	0	.	1	60	60	1+	0
82	2b	Mar-93	44	32	2	.	.	.	0	.	.	.	Mar-93	0	.	6	0	0	0	0
83	1b	Ago-93	40	21	1a	.	Set-93	1	0	.	.	.	Maio-95	0	.	1	60	60	0	0
84	2b	Mar-93	54	33	1e	1	Out-93	1	1	Out-97	3	.	.	1	Out-97	5	48	55	0	0
85	2b	Abr-93	47	26	1e	1	Out-93	3	1	Out-93	3	.	.	1	Nov-93	5	0	7	0	0
86	3b	Abr-93	63	43	1e	1	Nov-93	1	0	0	.	1	60	60	1+	0
87	3b	Mar-93	52	31	1b	.	Abr-93	1	1	Mai-95	4	2	.	1	Jul-97	5	25	52	0	1+
88	1b	Dez-92	49	37	1a	.	Jan-93	1	0	.	.	.	Maio-93	0	.	6	4	5	0	0
89	2b	Jan-93	64	48	1b	.	Out-93	1	0	.	.	.	Maio-95	0	.	6	19	28	0	0
90	2b	Nov-93	51	35	1b	.	Nov-93	1	1	Jan-94	2	2	.	1	Dez-94	5	24	13	0	0
91	3b	Mai-93	53	37	1e	1	Jul-93	1	0	0	.	1	60	60	1+	0
92	1b	Mar-93	59	37	1a	.	Mai-93	1	1	Maio-95	3	.	.	1	Jul-97	5	24	52	0	0

93	3b	Abr-93	63	48	1e	2	Jul-93	3	1	Jul-93	3	.	.	1	Jul-93	5	0	3	1+	0
94	2b	Mai-93	58	43	1e	1	Dez-93	1	1	Ago-94	3	2	.	1	Dez-95	5	8	31	0	1+
95	3b	Mai-93	56	31	1e	1	Set-93	1	1	Mai-97	3	.	.	1	Mai-97	5	44	48	0	0
96	2b	Dez-92	66	48	1e	1	Fev-93	1	1	Mai-93	2	2	.	1	Nov-93	5	3	11	1+	0
97	3b	Abr-93	73	57	1e	2	Abr-94	1	1	Out-94	4	.	.	1	Out-94	5	6	18	0	0
98	3b	Jun-93	53	34	1e	1	Dez-93	1	0	0	.	1	60	60	0	0
99	3b	Jun-93	68	49	1e	1	Jul-94	1	0	0	Set-94	4	16	16	1+	0
100	2b	Jul-93	68	51	1e	1	Jan-94	1	0	0	.	1	60	60	0	0
101	3b	Jul-93	67	45	1e	1	Set-93	3	1	Set-93	3	.	.	1	Set-93	5	0	2	0	0
102	2b	Jul-93	45	29	1e	1	Dez-93	1	1	Dez-96	3	.	.	1	Jun-97	5	36	47	0	0
103	3b	Jul-93	71	56	1e	1	Fev-94	1	0	0	.	1	60	60	1+	0
104	3b	Jul-93	56	38	2	.	.	.	1	Jul-93	3	.	.	1	Jul-93	5	0	0	0	0
105	2b	Ago-93	41	21	1e	1	Mar-94	1	1	Abr-96	4	2	.	1	Mai-96	5	25	33	0	0
106	3b	Set-93	53	35	1e	2	Mar-94	4	1	Abr-94	4	.	.	1	Abr-94	5	1	7	1+	0
107	1b	Ago-93	28	13	1a	.	Ago-93	1	0	0	.	1	60	60	0	1+
108	3b	Ago-93	89	69	2	.	.	.	1	Ago-93	3	.	.	1	Ago-93	5	0	0	0	0
109	2b	Ago-93	49	33	1e	1	Dez-93	1	1	Abr-96	3	.	.	1	Abr-96	5	28	32	0	0
110	3b	Set-93	48	31	2	.	.	.	1	Set-93	3	.	.	1	Set-93	5	0	0	0	0
111	3b	Jan-93	84	66	1e	1	Mai-93	1	1	Out-93	2	.	.	1	Out-93	5	5	9	0	2+
112	2b	Jun-93	43	28	1b	.	Ago-93	1	1	Abr-94	2	.	.	0	.	1	8	60	0	1+
113	3b	Abr-93	48	30	2	.	.	.	1	Abr-93	4	.	.	1	Mai-93	5	0	1	0	2+
114	1b	Ago-93	33	18	1a	.	Set-93	1	0	.	.	.	Out-93	0	.	6	1	2	0	0
115	3b	Abr-93	48	21	1e	2	Jul-93	3	1	Jul-93	3	.	.	1	Dez-93	5	0	8	0	3+
116	1b	Abr-93	37	19	1b	.	Jun-93	1	1	Abr-96	4	2	.	1	Jun-96	5	34	38	0	2+
117	3b	Out-93	52	30	2	.	.	.	1	Out-93	3	.	.	1	Out-93	5	0	0	0	0
118	1b	Abr-93	41	28	1b	.	Ago-93	1	0	.	.	.	Dez-95	0	.	6	28	32	1+	0
119	2b	Abr-93	61	38	1e	1	Jun-93	1	1	Nov-93	4	.	.	1	Nov-93	5	5	7	0	0
120	3b	Nov-93	57	40	1e	2	Jul-94	1	1	Mai-95	3	2	.	1	Mai-95	5	14	18	0	2+
121	2a	Ago-93	45	27	1b	.	Dez-93	1	1	Abr-94	3	.	.	1	Nov-94	5	11	15	0	2+
122	3b	Nov-93	37	22	1e	1	Jun-94	1	1	Set-94	3	2	.	1	Abr-95	5	3	17	0	1+
123	2b	Nov-93	38	21	1e	1	Jan-94	1	1	Set-97	3	.	.	1	Set-97	5	44	46	1+	1+
124	3b	Nov-93	60	42	1e	1	Abr-94	1	0	0	.	1	60	60	0	0
125	2a	Dez-93	48	32	1a	.	Jan-94	1	1	Jul-98	3	3	.	1	Set-98	5	55	57	1+	1+

126	2b	Dez-93	65	51	1e	1	Fev-94	3	1	Fev-94	3	.	.	1	Fev-94	5	0	2	1+	0
127	3b	Nov-93	75	60	1e	1	Jun-94	1	1	Mar-95	3	.	.	1	Mar-95	5	9	28	0	0
128	3b	Nov-93	57	41	1e	2	Abr-94	1	1	Jun-94	3	.	.	1	Jun-94	5	2	7	0	0
129	3b	Nov-93	64	50	1e	1	Ago-94	1	0	.	.	.	Jan-96	0	.	6	17	26	0	0
130	3b	Dez-93	45	32	1e	1	Jul-93	2	1	Jul-94	2	.	.	1	Jul-95	5	0	19	1+	2+
131	1b	Jun-93	43	30	1b	.	Out-93	1	0	.	.	.	Ago-96	0	.	6	34	39	1+	1+
132	2b	Fev-93	53	38	1e	1	Jun-93	1	0	.	.	.	Set-95	0	.	1	60	60	0	1+
133	3b	Set-93	70	47	2	.	.	.	1	Set-93	.	.	.	1	Set-93	5	0	0	2+	0
134	2a	Jul-93	37	18	1b	.	Set-93	1	0	.	.	.	Out-93	0	.	6	1	3	0	2+
135	2b	Jul-93	43	26	1b	.	Nov-93	1	1	Mar-94	3	1	.	0	.	1	4	60	2+	3+
136	1b	Jul-93	54	36	1b	.	Jul-93	2	1	Jul-93	2	1	Jan-97	0	.	6	0	43	1+	0
137	3b	Jan-93	65	51	1e	1	Mar-93	3	1	Mar-93	3	.	.	1	Jan-94	5	0	12	0	0
138	3b	Out-93	55	40	1e	1	Fev-94	1	1	Jun-95	3	.	.	1	Nov-95	5	5	25	0	2+
139	2b	Fev-93	50	31	1e	1	Mai-93	1	1	Fev-97	4	.	.	1	Fev-97	5	45	48	0	2+
140	3b	Nov-93	64	50	1e	1	Mar-94	2	1	Mar-94	2	.	.	1	Mar-94	5	0	4	0	0
141	3b	Dez-93	55	40	1e	2	Jul-94	4	1	Jul-94	4	.	.	1	Jul-94	5	0	7	1+	0
142	2b	Ago-93	46	27	1e	1	Fev-94	1	1	Abr-94	2	2	.	1	Jan-95	5	2	17	0	0
143	1b	Jun-94	50	31	1a	.	Jun-94	1	0	0	.	1	60	60	1+	0
144	3b	Jan-94	58	47	1e	1	Mai-94	1	1	Ago-94	3	2	.	1	Fev-95	5	3	13	0	1+
145	3b	Nov-94	56	36	1e	1	Set-95	1	1	Nov-98	3	.	.	1	Nov-98	5	38	48	0	1+
146	2b	Jan-94	55	33	2	.	.	.	0	.	.	.	Jan-94	0	.	6	0	0	1+	0
147	2b	Mar-94	69	56	1e	1	Jun-94	1	0	0	.	1	60	60	1+	1+
148	1b	Jan-94	66	40	1a	.	Fev-94	1	0	0	.	1	60	60	1+	0
149	3b	Fev-94	49	33	1e	1	Mar-94	1	0	0	.	1	60	60	0	0
150	3b	Fev-94	77	61	2	.	.	.	1	Fev-94	3	.	.	1	Fev-94	5	0	0	2+	0
151	3b	Mar-94	41	25	1e	1	Jul-94	4	1	Jul-94	4	.	.	1	Out-95	5	0	19	0	0
152	2b	Mar-94	67	52	2	.	.	.	0	.	.	.	Mar-94	0	.	6	0	0	1+	1+
153	2b	Mar-94	61	43	1e	1	Abr-94	1	0	0	.	1	60	60	1+	0
154	3b	Fev-94	60	39	1e	1	Jul-94	1	0	0	.	1	60	60	2+	1+
155	3b	Mar-94	54	36	1e	1	Ago-94	1	0	0	.	1	60	60	0	0
156	3b	Mar-94	72	50	1e	1	Ago-94	1	0	.	.	.	Mar-96	0	.	6	19	24	0	1+
157	3b	Mar-94	53	36	1b	.	Nov-94	1	1	Jul-95	4	2	.	1	Mar-99	5	8	60	0	1+
158	1b	Fev-94	34	25	1a	.	Abr-94	1	1	Jan-95	3	1	.	1	Abr-95	5	9	14	0	1+

159	2b	Mar-94	50	35	1e	1	Out-94	1	1	Out-98	3	.	.	1	Mar-99	5	48	60	0	0
160	3b	Mar-94	45	28	1e	1	Jul-94	3	1	Jul-94	3	.	.	1	Out-94	5	0	7	0	0
161	3b	Abr-94	69	50	1e	1	Ago-94	1	1	Out-94	3	.	.	1	Out-94	5	2	6	1+	0
162	3b	Abr-94	78	58	1e	1	Ago-94	1	0	.	.	.	Out-98	0	.	6	51	54	0	0
163	3b	Abr-94	58	43	1e	1	Set-94	1	0	0	.	1	60	60	0	1+
164	3b	Abr-94	56	36	1e	1	Out-94	1	1	Mar-96	3	2	.	1	Out-98	5	17	54	0	0
165	3b	Abr-94	74	56	2	.	.	.	1	Abr-94	3	.	.	1	Abr-94	5	0	0	0	1+
166	2b	Abr-94	38	20	1e	1	Out-94	2	1	Out-94	2	2	.	1	Out-95	5	0	18	1+	1+
167	1b	Mar-94	49	32	1a	.	Abr-94	1	0	0	.	1	60	60	2+	1+
168	1b	Mar-94	34	18	1b	.	Set-94	1	0	0	.	1	60	60	1+	0
169	3b	Jul-94	46	30	1e	2	Jul-94	4	1	Jul-94	.	.	.	1	Ago-94	5	0	1	0	0
170	3b	Mai-94	60	42	1e	1	Set-94	1	1	Mai-95	2	1	.	1	Abr-96	5	8	23	0	2+
171	1b	Fev-94	53	39	1b	.	Jul-94	1	0	0	.	1	60	60	0	0
172	2b	Mai-94	67	43	2	.	.	.	0	.	.	.	Mai-94	0	.	6	0	0	1+	1+
173	3b	Mai-94	51	34	2	.	.	.	1	Mai-94	3	.	.	1	Mai-94	5	0	0	1+	1+
174	1b	Mar-94	30	16	1b	.	Mai-94	1	0	0	.	1	60	60	1+	0
175	3a	Fev-94	40	25	2	.	.	.	1	Fev-94	3	.	.	1	Fev-94	5	0	0	0	1+
176	1b	Jan-94	48	29	1a	.	Fev-94	1	0	0	.	1	60	60	1+	0
177	1b	Abr-94	51	33	1b	.	Jun-94	1	1	Abr-95	4	3	.	1	Mai-95	5	10	13	0	0
178	3b	Mai-94	59	43	1e	1	Mai-96	4	1	Mai-96	4	.	.	1	Mai-96	5	0	3	0	1+
179	3b	Dez-93	56	36	1e	1	Jun-94	2	1	Jun-94	2	2	.	1	Mar-96	5	0	27	0	2+
180	3b	Jun-94	41	33	1e	1	Nov-94	1	0	.	.	.	Out-98	0	.	6	48	53	1+	0
181	3b	Jun-94	39	25	1e	1	Out-94	1	0	.	.	.	Set-97	0	.	6	35	40	0	2+
182	3b	Jun-94	38	22	1e	1	Jun-95	1	1	Ago-95	3	.	.	1	Dez-95	5	2	18	1+	0
183	3b	Jun-94	57	34	1e	1	Out-94	3	1	Out-94	3	.	.	1	Jul-95	5	0	13	0	0
184	3b	Jul-94	75	60	1e	2	Dez-94	1	0	0	.	1	60	60	0	1+
185	3b	Abr-94	41	24	1e	1	Jan-95	1	1	Jan-98	3	2	.	1	Jul-96	5	18	27	0	1+
186	3b	Jun-94	53	33	1e	1	Mar-95	1	0	0	.	1	60	60	0	1+
187	3b	Ago-94	39	25	1e	1	Fev-95	1	1	Jul-95	2	.	.	1	Out-95	5	5	14	1+	1+
188	1b	Jul-94	34	16	1a	.	Ago-94	1	0	0	.	1	60	60	1+	0
189	3b	Ago-94	62	44	1e	1	Mar-95	1	0	0	.	1	60	60	0	0
190	1b	Jun-94	54	34	1a	.	Jun-94	1	0	0	.	1	60	60	1+	0
191	3b	Ago-94	71	49	1e	1	Abr-95	1	0	0	.	1	60	60	0	0

192	1b	Mai-94	29	14	1a	.	Set-94	1	0	0	.	1	60	60	0	0
193	3b	Set-94	74	53	1e	2	Jan-95	1	0	0	.	1	60	60	0	0
194	2b	Set-94	36	18	1e	1	Mar-95	1	1	Out-96	3	.	.	1	Out-96	5	19	25	2+	0
195	3b	Set-94	77	58	1e	1	Fev-95	2	1	Fev-95	2	.	.	1	Out-96	5	0	25	0	0
196	1b	Jan-94	43	23	1b	.	Mar-94	1	0	.	.	.	Mar-94	0	.	6	0	3	1+	1+
197	3b	Ago-94	70	54	2	.	.	.	1	Ago-94	3	.	.	1	Ago-94	5	0	0	2+	1+
198	2b	Set-94	62	43	1e	1	Fev-95	1	1	Mai-96	4	.	.	1	Dez-96	5	15	27	0	1+
199	1b	Ago-94	39	23	1a	.	Set-94	1	0	0	.	1	60	60	0	1+
200	1b	Jul-94	65	45	1e	1	Mai-95	1	1	Jun-97	3	.	.	1	Mar-99	5	25	56	0	0
201	3a	Out-94	56	38	2	.	.	.	1	Out-94	3	.	.	1	Out-94	5	0	0	0	0
202	3b	Out-94	33	15	1d	.	Mai-95	1	1	Mai-98	3	.	.	1	Mai-98	5	36	43	0	0
203	1b	Set-94	40	14	1b	.	Nov-94	1	0	0	.	1	60	60	0	0
204	3b	Nov-94	48	30	1d	.	Jun-95	1	1	Dez-95	3	.	.	1	Abr-96	5	6	17	0	0
205	1b	Dez-94	64	48	1a	.	Dez-94	1	1	Nov-95	2	3	.	0	.	1	0	60	0	0
206	3b	Dez-94	44	23	2	.	.	.	1	Dez-94	3	.	.	1	Dez-94	5	0	0	1+	1+
207	3b	Dez-94	73	51	1e	1	Jun-95	1	1	Jan-96	3	.	.	1	Jan-96	5	7	13	0	1+
208	3b	Out-94	74	51	2	.	.	.	1	Out-94	3	.	.	1	Out-94	5	0	0	1+	0
209	2a	Abr-94	66	50	1b	.	Jul-94	2	1	Abr-94	2	1	.	0	.	1	0	60	1+	0
210	3b	Jan-94	54	36	1e	1	Ago-94	1	1	Mar-98	4	2	.	1	Set-98	5	41	56	2+	1+
211	1b	Mar-94	57	41	1a	.	Mar-94	1	0	0	.	1	60	60	0	2+
212	3b	Dez-94	43	28	1b	.	Abr-95	4	1	Abr-95	4	1	.	1	Ago-95	5	0	8	1+	1+
213	2b	Jul-94	49	31	1b	.	Jul-95	1	1	Abr-96	3	.	.	1	Dez-96	5	9	17	2+	0
214	2b	Jan-94	67	47	1	.	Jun-94	1	0	0	.	1	60	60	2+	2+
215	3b	Fev-94	33	16	1e	1	Mai-94	1	1	Jul-94	2	2	.	1	Nov-94	5	2	9	0	1+
216	1b	Abr-94	51	31	1a	.	Abr-94	1	0	0	.	1	60	60	0	1+
217	1b	Set-94	63	29	1a	.	Set-94	2	1	Set-94	2	1	.	0	.	1	0	60	0	1+
218	1b	Dez-93	63	36	1a	.	Jan-94	1	1	Jul-94	2	3	.	0	.	1	6	60	2+	3+
219	1b	Nov-94	43	30	1b	.	Dez-94	1	1	Dez-98	4	2	.	0	.	1	48	60	1+	1+
220	1b	Out-94	36	23	1a	.	Nov-94	1	0	0	.	1	60	60	0	0

ANEXO 3

CURVAS DE SOBREVIDA SEGUNDO ESTADIAMENTO DO CARCINOMA DE COLO UTERINO

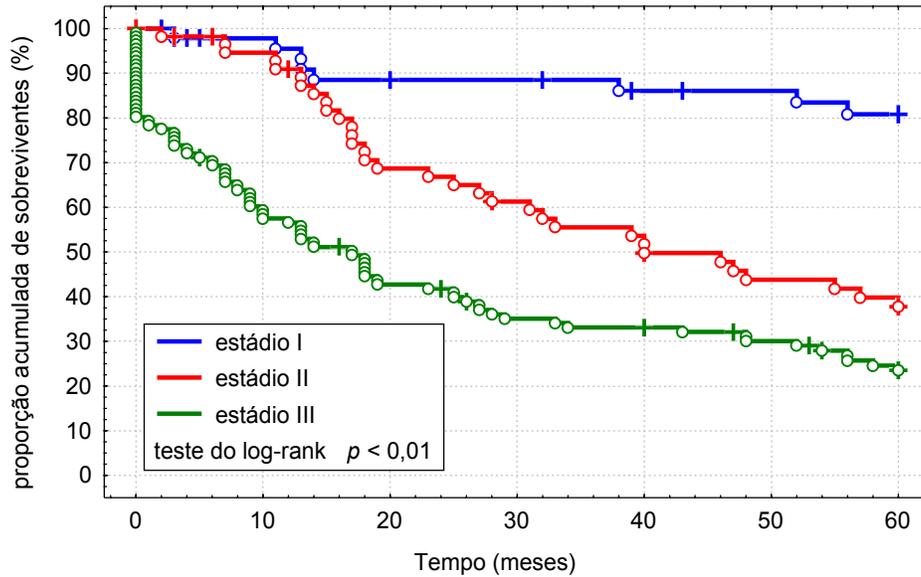


Figura 9. Sobrevida total das mulheres segundo estágio do carcinoma de colo uterino.

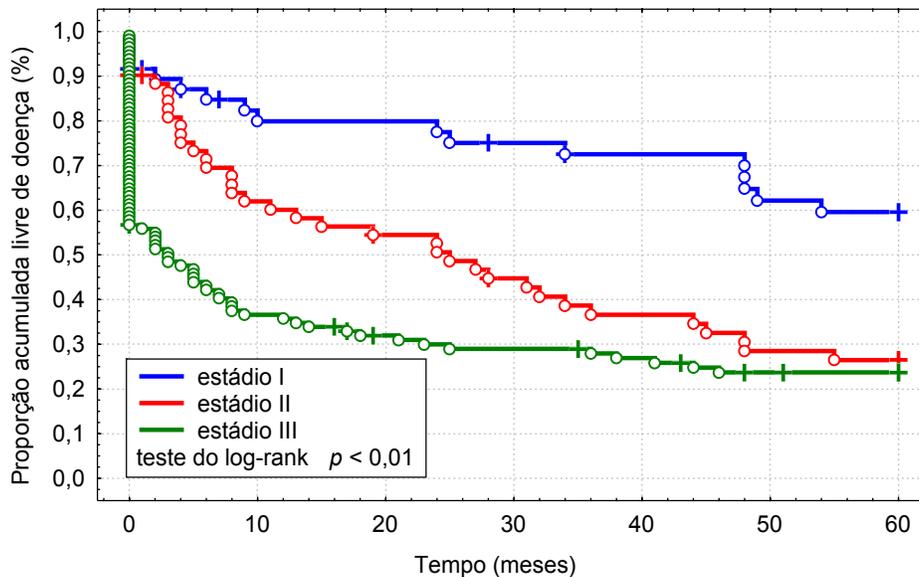


Figura 10. Sobrevida livre de doença das mulheres, segundo estágio do carcinoma de colo uterino.