

Associação entre o polimorfismo no códon 72 da p53 e as lesões pré-malignas e malignas cervicais

Association of codon 72 polymorphism with premalignant and malignant cervical lesions

Fernando Anschau¹, Virgínia Minghelli Schmitt², Manoel Afonso Guimarães Gonçalves³, Bernardo Garicochea⁴

RESUMO

Objetivos: testar a hipótese de que o polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* é fator de risco para as lesões pré-malignas e malignas cervicais associadas ou não ao papilomavírus humano (HPV). **Métodos:** foram incluídas amostras de cérvix uterina, para pesquisa de DNA de HPV e do polimorfismo no códon 72 da p53 com o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR), de 155 pacientes que se submeteram à biópsia cervical. Foram formados três grupos de acordo com o diagnóstico histológico: lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau (LSIL), lesão escamosa intra-epitelial de alto grau (HSIL) e carcinoma cervical. Aquelas pacientes sem alterações displásicas, citológicas e histológicas, foram consideradas controles. Para testar a associação entre o polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* e os grupos, foi utilizado o teste de χ^2 . Considerou-se como significativo o intervalo de confiança no nível de 95% ($\alpha=0,05$). **Resultados:** quarenta pacientes tiveram o diagnóstico histológico de carcinoma cervical, 18 tinham HSIL, 24 tinham LSIL e 73 foram consideradas controles. O genótipo Arg/Arg p53 foi encontrado em 60,0% das pacientes com câncer, 50,0% dos casos com HSIL, 45,8% dos casos com LSIL e em 45,2% dos controles. Não houve diferença significativa entre as proporções de cada genótipo da p53 nos diferentes grupos independente da presença do HPV (χ^2 : 3,7; $p=0,716$). **Conclusões:** nossos dados não suportam a hipótese de que o polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* é importante no desenvolvimento de lesões cervicais pré-malignas e malignas associadas ou não ao HPV.

PALAVRAS-CHAVE: Proteína p53; Polimorfismo; Neoplasias do colo uterino; Papillomavirus humano; Condições pré-cancerosas

ABSTRACT

Purpose: to test the hypothesis that gene *TP53* codon 72 polymorphism is a risk factor for premalignant and malignant cervical lesions associated or not with human papillomavirus (HPV). **Methods:** uterine cervical samples were collected for HPV DNA and *TP53* codon 72 polymorphism tests from 155 patients who underwent cervical biopsy. Three groups were formed according to histological diagnosis: low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) and cervical carcinoma. Subjects without cytological and histological displasic changes were considered controls. To verify the association between the gene *TP53* codon 72 polymorphism and the groups, the χ^2 test was applied. Confidence interval was considered significant at 95% ($\alpha=0.05$). **Results:** forty subjects were found to present cervical carcinoma, 18 had HSIL, 24 had LSIL and 73 were grouped as controls. The genotype Arg/Arg p53 was found in 60% of the patients with cancer, in 50.0% of the cases with HSIL, 45.8% with LSIL, and in 45.2% of the controls. No significant differences were identified in the frequencies of p53 genotype between all groups, independently of the presence of HPV (χ^2 : 3.7; $p=0.716$). **Conclusions:** our data do not support hypothesis that the gene *TP53* codon 72 polymorphism is important for the development of pre-malignant and malignant cervical lesions associated or not with HPV.

KEYWORDS: Protein p53; Polymorphism; Cervix neoplasms; Papillomavirus, human; Precancerous conditions

Estudo desenvolvido no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS - Porto Alegre (RS) - Brasil.

1 Preceptor do Serviço de Ginecologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS - Porto Alegre (RS) - Brasil.
2 Professor Doutor da Faculdade de Farmácia da PUCRS; Chefe do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS - Porto Alegre (RS) - Brasil.

3 Professor Doutor do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS - Porto Alegre (RS) - Brasil.

4 Professor Doutor do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS - Porto Alegre (RS) - Brasil.

Correspondência: Fernando Anschau

Centro Clínico do Hospital São Lucas da PUCRS

Av. Ipiranga, 6690, cj. 217 - 90610-000 - Porto Alegre-RS - FAX: (51) 3339-2222 - Telefone: (51) 3339-2222 - e-mail: anschau@terra.com.br

Recebido em: 18/7/2005

Aceito com modificações em: 24/10/2005

Introdução

O gene *TP53* é supressor tumoral, cuja proteína p53 responde pela inibição da proliferação celular e pela apoptose. Este gene está frequentemente mutado em cânceres humanos e a alteração da função da p53 parece ser fundamental na gênese tumoral¹.

Existe polimorfismo no códon 72 do gene *TP53*, podendo codificar uma arginina (Arg) ou uma prolina (Pro), determinando a presença de três genótipos: homozigoto para Arg (Arg/Arg p53), heterozigoto (Arg/Pro p53) ou homozigoto para Pro (Pro/Pro p53). De uma perspectiva funcional, os dois alelos parecem ser equivalentes, não interferindo na atividade da proteína. Todavia, alguns estudos sugeriram que pacientes Arg/Arg p53 teriam risco maior de desenvolver câncer cervical associado ao papiloma vírus humano (HPV)^{2,3}.

Três proteínas sintetizadas pelo HPV durante a fase precoce (*early* = E) do seu ciclo replicativo, E6, E7 e E5, desempenham um papel fundamental na patogenicidade do vírus. A proteína E6 atua como ativador do processo de degradação da proteína p53. A proteína E7, por sua vez, liga-se e inativa a proteína do retinoblastoma, que também é supressor tumoral que apresenta função reguladora do ciclo celular. A proteína E5 interfere na reciclagem dos receptores do fator de crescimento epitelial promovendo a proliferação celular.

A proteína p53 que possui uma Arg na posição 72 apresenta velocidade de degradação maior do que a que possui uma Pro nesta posição em presença da proteína E6 do HPV 16 ou 18. Esta informação indica que a proteína p53 com Arg seja mais suscetível à degradação mediada pela proteína E6 do HPV².

Grande proporção de amostras de câncer de cérvix uterina (76%) se mostraram homozigoto para o alelo Arg em comparação com amostras cervicais normais (37%). As pacientes Arg/Arg p53 estariam sete vezes mais predispostas a desenvolver câncer cervical associado ao HPV em comparação com aquelas com um ou dois alelos Pro². Todavia, esta relação entre Arg/Arg p53 e câncer de colo uterino associado ao HPV ainda não está totalmente estabelecida. Não se encontraram evidências de correlação entre o polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* e risco para câncer cervical HPV positivo em uma série de outros estudos⁴⁻⁹.

A infecção com uma variante do HPV 16 (HPV 16 350T) em pacientes homozigotos para arginina no códon 72 da p53 está associada a alto risco para o desenvolvimento do câncer cervical³. Nestas pacientes homozigotos para Arg, o polimorfismo do

gene *TP53* influenciaria a transformação das lesões intra-epiteliais cervicais de alto grau em câncer¹⁰.

As informações sobre a relação entre o polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* e o risco para desenvolvimento de lesões cervicais na presença de HPV ainda são conflitantes. Propusemos, portanto, o presente estudo com o intuito de avaliar a relação deste polimorfismo com as lesões pré-malignas e malignas do colo uterino associadas ou não ao HPV.

Pacientes e Métodos

Esta pesquisa foi realizada no Serviço de Ginecologia do Hospital São Lucas da PUCRS no período de julho de 2001 a setembro de 2002. A população do estudo foi constituída por pacientes que buscaram assistência para realização de exame colposcópico e que tiveram indicação de biópsia de colo uterino.

A colposcopia foi indicada nos casos de alterações citológicas cervicais sugestivas de câncer, de lesões pré-malignas ou de significado indeterminado; nos casos de teste de Schiller positivo, mesmo com citologia cervical negativa, e em casos de lesões friáveis ou tumorações cervicais visíveis no exame especular.

Os critérios de inclusão foram pacientes que após avaliação colposcópica apresentaram alguma indicação de biópsia de colo uterino. Consideraram-se como indicação de biópsia de colo uterino todas as leucoplasias, mesmo se o resultado da citologia cervical fosse negativo; as lesões do epitélio pavimentoso que se tornam brancas após aplicação do ácido acético (epitélio acetobranco, mosaico, pontilhado); lesões com vasos atípicos; todas as lesões não habituais, ou para as quais não se teve interpretação, e os casos de suspeita de câncer invasor de colo uterino.

Foram excluídas as pacientes que apresentavam tratamento prévio para lesão escamosa intra-epitelial ou câncer cervical e aquelas que haviam recebido tratamento radioterápico prévio sobre a região pélvica.

O cálculo do tamanho da amostra levou em consideração nível de confiança de 95%, com poder de 90%, razão de chance (*odds ratio*) de 3,5, tendo em vista prevalência de 46% para o alelo Arg/Arg na população feminina em geral – aqui representada pelos controles. O tamanho da amostra foi então estimado em 130 pacientes.

Foram incluídas, de maneira prospectiva e seqüencial, 155 pacientes. Todas as pacientes,

após apresentação e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foram submetidas à anamnese, exame ginecológico, colposcopia, coleta de material ecto e endocervical para pesquisa de DNA de HPV e do polimorfismo no códon 72 da p53 por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), além de biópsia de colo uterino para diagnóstico histológico. A média de idade foi de 38,9 anos (mínima de 18 anos e máxima de 75 anos).

As pacientes foram classificadas pelo resultado histológico da biópsia de colo uterino. Assim, selecionamos um grupo de pacientes com câncer cervical, um grupo com lesão intra-epitelial cervical de alto grau (HSIL) e um grupo com lesão intra-epitelial cervical de baixo grau (LSIL). Aquelas pacientes que não apresentaram alterações displásicas (citologia e histologia) no colo uterino foram classificadas como controles.

A retirada de células endo e ectocervicais para a pesquisa de DNA de HPV pela PCR foi realizada com Cytobrush. Tal material era deixado em suspensão em 10 mL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; 1 mM EDTA), estocadas à temperatura de -20°C até a extração do DNA.

As amostras para a pesquisa de DNA de HPV, após descongelamento, foram centrifugadas a 5200 rpm, sob refrigeração, e o sedimento ressuspenso em 500 µL de TE. Destes, 100 µL foram tratados com 100 µL de proteinase K/TE-50 (200 µg/mL de proteinase K 'DNase/RNase free' Gibco, 2% Tween 20, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5) e incubados durante uma noite a 37°C. Após inativação a 94°C por 10 minutos, as amostras foram desproteinizadas e conservadas a -20°C até o momento da análise.

O DNA total extraído das amostras foi submetido a uma amplificação por PCR, utilizando-se como *primers* consenso os seguintes oligonucleotídeos degenerados, complementares à região L1 do genoma viral¹¹. My 09 5'. CGT CC^A/_C AA^A/_G GGA^A/_T AC TGA TC .. 3' e My 11 5' .. GC^A/_C CAG GG^A/_T CAT AA^C/_T AAT GG .. 3'>

As condições para amplificação das amostras foram: 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de 95°C por um minuto, 55°C por um minuto, 72°C por um minuto; 72°C por 10 minutos¹².

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%, em tampão TAE, contendo 1 µg/mL de brometo de etídio e analisados sob luz ultravioleta.

A pesquisa do polimorfismo Arg/Pro foi efetuada com o uso de PCR utilizando os *primers*: 72S (5'.... TTG CCG TCC CAA GCA ATG GAT GA ... 3') e 72A (5'... TCT GGG AAG GGA CAG AAG ATG AC ... 3'), que amplificam o exon 4 do gene *TP53*, onde se encontra o códon 72.

As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C durante três minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C durante três minutos. O fragmento resultante, de 199 pb, foi então digerido com a enzima de restrição *Tha I*: o alelo Pro não é digerido, e o alelo Arg resulta em duas bandas de 113 pb e 86 pb. O produto de digestão foi analisado com eletroforese em gel de poli(acrilamida 15% em TBE, corado com brometo de etídio e observado em luz ultravioleta.

Os genótipos foram interpretados de acordo com as bandas verificadas: somente a banda de 199 pb indica genótipo Pro/Pro; bandas de 199, 113 e 86 pb, genótipo Pro/Arg; bandas de 113 e 86 pb, genótipo Arg/Arg.

As pacientes homozigotas para o alelo que codifica arginina na posição 72 do gene *TP53* foram caracterizadas como com genótipo Arg/Arg p53; as homozigotas para o alelo que codifica prolina na posição 72 do gene *TP53*, são aquelas citadas como com genótipo Pro/Pro p53 e as heterozigotas são aquelas cujo genótipo é citado como Arg/Pro p53¹³.

Esta pesquisa foi previamente aprovada pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

O programa de computador utilizado para armazenagem dos dados deste estudo foi o Epi-Info 2000. Para testar a associação entre o polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* e os grupos foi utilizado o teste de χ^2 . Considerou-se como significativo o intervalo de confiança de 95% ($\alpha=0,05$).

Resultados

Foram incluídas 155 pacientes neste estudo. Houve predomínio de mulheres casadas ou em união consensual (69%). Quarenta e oito (31%) pacientes eram solteiras. Cento e quatro (67,1%) pacientes não haviam concluído o ensino fundamental, sendo que seis (4%) eram analfabetas. Cinquenta e uma (32,9%) mulheres eram donas de casa, nove (5,8%) estavam desempregadas e oito (5,2%) se disseram aposentadas. Entre as 87 (56,1%) mulheres que exerciam ocupações fora do lar, a maior parte correspondia a empregadas domésticas. A média de idade da primeira relação sexual foi de 17 anos e o número médio de parceiros sexuais foi de 2,5.

Quarenta mulheres tiveram o diagnóstico histológico de carcinoma cervical (dois casos de adenocarcinoma e 38 carcinomas escamosos), 18 tinham HSIL, 24 LSIL e 73 foram classificadas como controles. O genótipo Arg/Arg p53 foi identificado em 24 (60%) mulheres com câncer, nove (50%) com HSIL, 11 (45,8%) com LSIL e em 33 (45,2%) controles. O genótipo Pro/Pro p53 foi o menos prevalente em todos os grupos: 7,5% no grupo com câncer, 5,6% no grupo HSIL, 8,3% no grupo LSIL e 13,7% no grupo controle (Tabela 1). Não houve diferença significativa entre as proporções de cada genótipo nos diferentes grupos (χ^2 : 3,7; p: 0,716).

Tabela 1 - Distribuição dos genótipos da proteína p53 pelos grupos de pacientes.

Grupos	Genótipo p53						Total
	Arg/Arg		Arg/Pro		Pro/Pro		
	n	%	n	%	n	%	
Câncer	24	60,0	13	32,5	3	7,5	40
HSIL	9	50,0	8	44,4	1	5,6	18
LSIL	11	45,8	11	45,8	2	8,3	24
Controle	33	45,2	30	41,1	10	13,7	73
Total	77	49,7	62	40,0	16	10,3	155

1. $\chi^2 = 3,7$; valor de p=0,716

Grupos:

Câncer: câncer de colo uterino

HSIL: lesão escamosa intra-epitelial de alto grau

LSIL: lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau

Controle: histologia e citologia cervicais sem alterações displásicas

Genótipos:

Arg/Arg: homocigoto para o alelo que codifica arginina na posição 72 do gene *TP53*

Pro/Pro: homocigoto para o alelo que codifica prolina na posição 72 do gene *TP53*

Arg/Pro: heterocigoto arginina/prolina na posição 72 do gene *TP53*

Das pacientes com câncer, 34 (85%) tinham DNA de HPV. As pacientes com HSIL apresentaram DNA de HPV em 11 (63%) casos. Das pacientes com LSIL, 13 (54%) tinham DNA de HPV. Doze (16%) controles apresentavam DNA de HPV. Quando o DNA do HPV estava presente, o genótipo Arg/Arg p53 foi identificado em 21 (62,7%) de 34 pacientes com câncer, em sete (63,6%) de 11 pacientes com HSIL, em cinco (38,4%) de 13 pacientes com LSIL e em sete (58,3%) de 12 pacientes controle. Quando o DNA do HPV estava ausente, foram identificadas pacientes homocigotas Arg/Arg p53 em três (50,0%) de seis casos de câncer, em dois (28,5%) de sete casos com HSIL, em seis (54,5%) de 11 casos com LSIL e em 26 (42,6%) de 61 controles. Não encontramos associação significativa entre o diagnóstico histológico e a presença do HPV em relação aos genótipos da p53 (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição dos genótipos da proteína p53 pelos grupos relacionados e presença de HPV.

Grupos e presença de HPV	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	Total
Câncer sem HPV	3	2	1	6
Câncer com HPV	21	11	2	34
HSIL sem HPV	2	4	1	7
HSIL com HPV	7	4	0	11
LSIL sem HPV	6	4	1	11
LSIL com HPV	5	7	1	13
Controle sem HPV	26	27	8	61
Controle com HPV	7	3	2	12
Total	77	62	16	155

2. $\chi^2 = 9,12$; valor de p=0,823

HPV: papilomavírus humano

Grupos:

Câncer: câncer de colo uterino

HSIL: lesão escamosa intra-epitelial de alto grau

LSIL: lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau

Controle: histologia e citologia cervicais sem alterações displásicas

Genótipos:

Arg/Arg: homocigoto para o alelo que codifica arginina na posição 72 do gene *TP53*

Pro/Pro: homocigoto para o alelo que codifica prolina na posição 72 do gene *TP53*

Arg/Pro: heterocigoto arginina/prolina na posição 72 do gene *TP53*

Discussão

O HPV é agente necessário para o desenvolvimento do câncer cervical. Entretanto, o fato de que apenas uma fração das pacientes infectadas por este vírus progride para o câncer indica que o HPV isolado não é suficiente e traz a questão para a existência de co-fatores. A suscetibilidade genética poderia ser um co-fator importante neste aspecto.

O genótipo Arg/Arg p53 foi apontado como um potencial fator de risco para o câncer cervical associado ao HPV. Mulheres homocigotas para o alelo que codifica arginina na posição 72 do gene *TP53* teriam risco 7 vezes mais alto para câncer cervical associado ao HPV do que aquelas com ao menos uma prolina naquela posição. Outros autores associaram o genótipo Arg/Arg p53 a aumento de 20% no risco para câncer cervical quando comparado com o genótipo Arg/Pro. Esta associação parece biologicamente plausível, uma vez que foi demonstrado que a proteína E6 do HPV 16 e 18 reconhece e leva à degradação preferencialmente a variante Arg/Arg da p53^{2,14-16}.

No presente estudo, encontramos frequências similares dos genótipos Arg/Arg entre os grupos pesquisados: 60% no grupo com câncer, 50% no grupo com HSIL, 45,8% no grupo com LSIL e 45,2% no grupo controle. Esse modelo de distribuição dos genótipos da p53 já foi demonstrado por

outros autores^{5,6,17,18} que também não evidenciaram associação significativa entre o polimorfismo da p53 e o desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas cervicais.

Nossa amostra apresentou distribuição irregular no número dos diagnósticos histológicos e portanto dos grupos. Assim, podemos observar concentração maior no número de indivíduos do grupo com câncer e controle em detrimento dos grupos com lesões pré-malignas (LSIL e HSIL). Também é importante ressaltar que, apesar de esta distribuição heterogênea poder atuar como viés na interpretação dos resultados, os percentuais dos genótipos da p53 foram similares em todos os grupos.

Sabemos que o diagnóstico em doença cervical se baseia na citologia, colposcopia e histologia. Para o nosso estudo, a colposcopia foi meio de identificação da população a ser estudada (aquela com indicação de biópsia cervical) e não objeto de caracterização final dos grupos. Adotamos a histologia para este fim por ser o exame padrão-ouro no diagnóstico das alterações cervicais. Para os controles, a citologia cervical negativa também foi utilizada na caracterização do grupo, uma vez que todas as pacientes deste estudo apresentavam colposcopia com alguma alteração.

A forma de caracterização dos grupos é importante quando da extrapolação dos resultados e comparação dos dados com os da literatura. A histologia é o exame adotado pela maioria dos trabalhos para identificar os casos estudados^{2,3,7,15,19}. A formação do grupo controle difere porém de estudo para estudo, mas geralmente considera aquelas pacientes saudáveis com citologia cervical negativa ou sem história de câncer cervical, não se fazendo alusão à colposcopia^{4,20-22}. A identificação de um grupo controle com histologia normal foi utilizada por outros autores, que também não demonstraram relação evidente de risco para as lesões cervicais ao analisarem os diferentes genótipos da p53^{7,23}.

Apesar de vários estudos também não demonstrarem associação entre o polimorfismo no códon 72 da p53 e o câncer cervical^{20,24-26}, parece haver risco para o desenvolvimento do câncer quando subdividimos este grupo de acordo com o tipo celular em adenocarcinoma e carcinoma escamoso. O genótipo Arg/Arg p53, quando comparado com o Pro/Pro p53, esteve associado a aumento de 50% no risco de adenocarcinoma, mas não de carcinoma escamoso¹⁶. Apesar de termos incluído apenas duas pacientes com adenocarcinoma, não observamos esta subdivisão do grupo com câncer, o que poderia ter influenciado na análise final dos resultados.

A literatura é conflitante em relação à associação do polimorfismo da p53 ao desenvolvimento do câncer cervical. Apesar de sabermos que o HPV é fator importante no desenvolvimento das lesões pré-malignas e malignas cervicais, sendo o agente responsável pela inativação dos supressores tumorais e conseqüente multiplicação celular descontrolada, o polimorfismo da p53 não parece ser fator fundamental para o risco de desenvolvimento das alterações cervicais.

Nossos dados não suportam a hipótese de que o polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* é importante no desenvolvimento de lesões cervicais pré-malignas e malignas. Contudo, a presente tentativa de se identificar associação de risco entre o polimorfismo da p53 e as lesões pré-malignas e o câncer cervical associadas ou não ao HPV deverá ser contemplada no futuro com estudos de maior casuística e analisando uma gama mais ampla de variáveis que pudessem estar associadas a esta condição.

Referências

1. Wieland U, Pfister H. Papilomavirus em patologia humana: epidemiologia, patogênese e papel oncogênico. In: Gross GE, Barrasso R, editores. Infecção por papilomavirus humano: atlas clínico de HPV. Porto Alegre: Artmed; 1999. p. 1-18.
2. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*. 1998;393(6682):229-34.
3. Van Duin M, Snijders PJ, Vossen MT, Klaassen E, Voorhorst F, Verheijen RH, et al. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 2):317-25.
4. Rosenthal AN, Ryan A, Al-Jehani RM, Storey A, Harwood CA, Jacobs IJ. p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK. *Lancet*. 1998;352(9131):871-2.
5. Minaguchi T, Kanamori Y, Matsushima M, Yoshikawa H, Taketani Y, Nakamura Y. No evidence of correlation between polymorphism at codon 72 of p53 and risk of cervical cancer in Japanese patients with human papillomavirus 16/18 infection. *Cancer Res*. 1998;58(20):4585-6.
6. Tachezy R, Mikysková I, Saláková M, Van Ranst M. Correlation between human papillomavirus-associated cervical cancer and p53 codon 72 arginine/proline polymorphism. *Hum Genet*. 1999;105(6):564-6.

7. Giannoudis A, Graham DA, Southern SA, Herrington CS. p53 codon 72 Arg/Pro polymorphism is not related to HPV type or lesion grade in low- and high-grade squamous intra-epithelial lesions and invasive squamous carcinoma of the cervix. *Int J Cancer*. 1999;83(1):66-9.
8. Nishikawa A, Fujimoto T, Akutagawa N, Iwasaki M, Takeuchi M, Fujinaga K, et al. p53 polymorphism (codon-72) has no correlation with the development and the clinical features of cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2000;10(5):402-7.
9. Madeleine MM, Shera K, Schwartz SM, Daling JR, Galloway DA, Wipf GC, et al. The p53 Arg72Pro polymorphism, human papillomavirus, and invasive squamous cell cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9(2):225-7.
10. Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, et al. p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. *Cancer Res*. 2001;61(2):608-11.
11. Bauer HM, Manos MM. PCR detection of genital human papillomavirus. In: Persing D, editor. *Diagnostic molecular microbiology*. Philadelphia: American Society for Microbiology; 1993. p. 407-13.
12. Cuzick J, Terry G, Ho L, Hollingworth T, Anderson M. Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer*. 1994;69(1):167-71.
13. Ara S, Lee PS, Hansen MF, Saya H. Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acid Res*. 1990;18(16):4961.
14. Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Genta F, Tommasino M. Codon 72 polymorphism of p53 and its association with cervical cancer. *Lancet*. 1999;354(9174):218-9.
15. Makni H, Franco EL, Kaiano J, Villa LL, Labrecque S, Dudley R, et al. p53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. *Int J Cancer*. 2000;87(4):528-33.
16. Jee SH, Won SY, Yun JE, Lee JE, Park JS, Ji SS. Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a meta-analysis. *Int J Gynaecol Obstet*. 2004;85(3):301-8.
17. Yamashita T, Yaginuma Y, Saitoh Y, Kawai K, Kurakane T, Hayashi H, et al. Codon 72 polymorphism of p53 as a risk factor for patients with human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions and invasive cancer of the uterine cervix. *Carcinogenesis*. 1999;20(9):1733-6.
18. Bertorelle R, Chieco-Bianchi L, Del Mistro A. Papillomavirus and p53 codon 72 polymorphism. *Int J Cancer*. 1999;82(4):616-7.
19. Malcolm EK, Baber GB, Boyd JC, Stoler MH. Polymorphism at codon 72 of p53 is not associated with cervical cancer risk. *Mod Pathol*. 2000;13(4):373-8.
20. Kim JW, Roh JW, Park NH, Song YS, Kang SB, Lee HP. Polymorphism of TP53 codon 72 and the risk of cervical cancer among Korean women. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;184(2):55-8.
21. Santos AM, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Pereira D, Vasconcelos A, et al. TP53 codon 72 polymorphism and risk for cervical cancer in Portugal. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;159(2):143-7.
22. Comar M, Molin GD, Guaschino S, Campello C. p53 at codon 72 polymorphism, human papillomavirus infection and cervical lesions: a cross-sectional study from northeastern Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;114(2):210-4.
23. Settheetham-Ishida W, Kanjanavirojku N, Kularbkaew C, Ishida T. Human papillomavirus genotypes and the p53 codon 72 polymorphism in cervical cancer of northeastern Thailand. *Microbiol Immunol*. 2005;49(5):417-21.
24. Pegoraro R, Moodley J, Naiker S, Lanning P, Rom L. The p53 codon 72 polymorphism in black South African women and the risk of cervical cancer. *BJOG*. 2000;107(9):1164-5.
25. Wong YF, Chung TK, Cheung TH, Nobori T, Hampton GM, Wang VW, et al. p53 polymorphism and human papillomavirus infection in Hong Kong women with cervical cancer. *Gynecol Obstet Invest*. 2000;50(1):60-3.
26. Kucera E, Tong D, Reinthaller A, Leodolter S, Zeillinger R, Sliutz G. p53 polymorphism at codon 72: does it constitute a risk for squamous intraepithelial lesions and cervical cancer of the cervix in Central Europeans? *Wien Klin Wochenschr*. 2000;112(18):817-20.