



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

RAFAELA ROBERTA DE JAIME CURTI

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO rs4880 DE SOD2 NA
INFECÇÃO PELO HPV, NO DESENVOLVIMENTO DE
LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E DE CÂNCER DE
COLO DE ÚTERO**

RAFAELA ROBERTA DE JAIME CURTI

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO rs4880 DE SOD2 NA
INFECÇÃO PELO HPV, NO DESENVOLVIMENTO DE
LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E DE CÂNCER DE
COLO DE ÚTERO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como pré-requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Karen Brajão de Oliveira

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C978i Curti, Rafaela Roberta de Jaime.
Influência do polimorfismo rs4880 de SOD2 na infecção pelo HPV, no desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e no câncer de colo de útero / Rafaela Roberta de Jaime Curti. - Londrina, 2021.
63 f. : il.

Orientador: Karen Brajão de Oliveira.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Papilomavírus humano - Tese. 2. Lesões intraepiteliais cervicais - Tese. 3. Estresse oxidativo - Tese. 4. Variação de nucleotídeo único - Tese. I. Oliveira, Karen Brajão de . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

RAFAELA ROBERTA DE JAIME CURTI

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO rs4880 DE SOD2 NA
INFECÇÃO PELO HPV, NO DESENVOLVIMENTO DE
LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E DE CÂNCER DE
COLO DE ÚTERO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como pré-requisito para obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Karen Brajão de
Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Carolina Batista Ariza Tamarozzi
Centro Universitário Filadélfia - UniFil

Profa. Dra. Larissa Juliani Sanches
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 14 de maio de 2021.

Às que me acompanharam nessa jornada...

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Karen Brajão de Oliveira por todo cuidado, atenção, disponibilidade e orientação durante a elaboração deste trabalho, além do acolhimento ao seu laboratório, passo fundamental para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos membros da banca examinadora, Prof.^a Dr^a Carolina Batista Ariza Tamarozzi e Prof.^a Dr^a Larissa Juliani Sanches, pela colaboração com o aprimoramento deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e a Universidade Estadual de Londrina pelo incentivo à pesquisa e apoio institucional à Capes, CNPq e Fundação Araucária, e a PROPPG-UEL, pelo apoio financeiro para realização do projeto.

Aos Centros de Saúde Municipal Dr. Justiniano Clímaco da Silva (UBS Vivi Xavier) e Dr. Paulo Roberto Moita da Silva (UBS Armindo Guazzi), à Clínica de Colposcopia do CISMEDPAR e ao Ambulatório de Ginecologia do HC/HU/UEL, pelo auxílio na obtenção das amostras. Um agradecimento especial às pacientes que, por sua participação voluntária e doação das amostras, viabilizaram a realização deste estudo.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética Molecular e Imunologia (LAGMI), Ana Luiza Labatte Bonaldo, Paola Singi, Kleber Paiva Trugilo e Nilson Carlos de Jesus, por todo o ensinamento, paciência, conselhos e companheirismo cujo foram essenciais para a caminhada se tornar muito mais prazerosa. Em especial, a Nádia Calvo Martins Okuyama e a Eliza Pizarro Castilla por me acompanharem de perto nessa jornada. Dedico a todos minha admiração pessoal e profissional.

Aos meus colegas de turma de Mestrado, pela cordialidade e conhecimento compartilhado durante este período, contribuindo para a formação científica.

A todos os meus professores por todo conhecimento que me foi transmitido.

À minha família, em especial a minha mãe, Elizete Aparecida de Jaime, minha maior incentivadora, a qual compartilho e dedico todas as minhas vitórias. Assim como, minha madrinha Marissol Testa, meus tios Vera Brito e Hélio Brito e a minha prima Anna Paula Brito por serem meus maiores exemplos.

E por fim, elevo meus pensamentos e toda minha gratidão a Deus por todo o amparo, com o desejo de honrá-Lo através da minha vida e da minha profissão.

A Ciência é a luz que brilha na escuridão da ignorância humana.

Marcelo Marchi Negreira

CURTI, Rafaela Roberta de Jaime. **Influência do polimorfismo rs4880 de SOD2 na infecção pelo HPV, no desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e no câncer de colo de útero.** 2021. 63 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

O papilomavírus humano (HPV), amplamente difundido na população, é fator essencial para o desenvolvimento do câncer de colo de útero, terceiro tipo de câncer que mais acomete a população feminina. Alguns dos mais de 200 tipos do vírus podem acarretar lesões intraepiteliais escamosas cervicais e o câncer. Porém, para que a transformação maligna ocorra, são necessários cofatores, um exemplo são as espécies reativas (EROs), que podem ser neutralizadas pelo sistema antioxidante. A enzima SOD2, codificada pelo gene de mesmo nome, encontrada na mitocôndria, faz parte da primeira linha de defesa do organismo contra os danos causados pelo estresse oxidativo. Os polimorfismos genéticos podem influenciar na eficiência dessa enzima, dentre eles, o rs4880 é o mais estudado. Desse modo, objetivou-se associar este polimorfismo com a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas de baixo e alto grau (LIEBG e LIEAG) e o câncer em 407 mulheres atendidas pelo Sistema Único de Saúde, no Norte do Paraná. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e preenchimento dos questionários socioepidemiológico e de hábitos, foram coletadas amostras de secreção cervical para detecção do HPV por reação em cadeia da polimerase (PCR) e amostras de sangue para genotipagem do polimorfismo através de PCR seguida de restrição enzimática. Os produtos de PCR e de restrição foram submetidos à eletroforese em gel de poli(acrilamida) 10%. Foram incluídas no grupo HPV negativo (controle) 158 mulheres e, no grupo HPV positivo (caso), 249 mulheres. As mulheres infectadas foram posteriormente divididas nos grupos: sem lesão (n=90), LIEBG (n=20), LIEAG (n=67) e grupo câncer (n=72). Os dados encontrados sobre as características socioepidemiológicas e de hábitos corroboraram com os dados encontrados na literatura. Genotipicamente, o grupo controle distribuiu-se da seguinte forma: 82 (51,9%) TC, 47 (29,8%) TT e 29 (18,3%) CC. Já no grupo caso, a distribuição foi 137 (55,0%) TC, 65 (26,1%) TT e 47 (18,9%) CC. Esse é o primeiro trabalho que avalia a influência do polimorfismo rs4880 de SOD2 na infecção pelo HPV, o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e o câncer de colo de útero na população brasileira. Embora estudos adicionais sejam necessários para corroborar com os nossos resultados, nós demonstramos que os alelos e genótipos do polimorfismo rs4880 não foram associados com suscetibilidade à infecção por HPV nem com o desenvolvimento de LIEBG, LIEAG e de câncer cervical.

Palavras-chave: papilomavírus humano; lesões intraepiteliais cervicais; estresse oxidativo; variação de nucleotídeo único; diagnóstico molecular; MnSOD; Val16Ala.

CURTI, Rafaela Roberta de Jaime. **SOD2 rs4880 polymorphisms influence in HPV infection, in development of cervical intraepithelial lesions and in cervical cancer.** 2021. 63 p. Dissertation. (Master's in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

The Human Papillomavirus (HPV), highly incident worldwide, is an essential factor for cervical cancer development, the third type of cancer most incident in the female population. Some of the more than 200 known HPV types can lead to precancerous lesions called cervical squamous intraepithelial lesions and cancer. However, for the malignant transformation occur, some cofactors are needed, as the reactive oxygen species (ROS), which can be neutralized by the antioxidant system. The enzyme SOD2, encoded by the gene of the same name, is found in mitochondria and is part of the first line of defense against oxidative stress damage. Genetic polymorphisms that can act by altering the efficiency of the enzyme, among which the most studied is the rs4880. Thus, the purpose of the present study was to evaluate the association of this polymorphism with HPV infection and the development of low and high grade squamous intraepithelial lesions (LSIL and HSIL, respectively) and cervical cancer, in 407 women attended by the public health system in Northern Paraná, Brazil. After signing the Informed Consent Form and answering a socioepidemiological questionnaire, were collected cervical secretion sample for HPV detection by polymerase chain reaction (PCR) and blood sample for polymorphism genotyping through PCR followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP). PCR and restriction products were subjected to 10% polyacrylamide gel electrophoresis. HPV negative group (control) included 158 women and the HPV positive group (case) 249 women. The infected group was divided into No Lesion (n=90), LSIL (n=20), HSIL (n=67) and cervical cancer (n=72). The data found on socio-epidemiological characteristics and habits corroborated with data found in the literature. The distribution of genotypes in the control group was 82 (51.9%) women TC, 47 (29.8%) TT and 29 (18.3%) CC. In the case group, the distribution was 137 (55.0%) women TC, 65 (26.1%) TT and 47 (18.9%) CC. This is the first study evaluating the influence of SOD2 rs4880 polymorphism on HPV infection, the development of cervical intraepithelial lesions and cervical cancer in a Brazilian population. Although additional studies are needed to corroborate the results, it was demonstrated that the alleles and genotypes of the rs4880 polymorphism were neither associated with susceptibility to HPV infection nor with LSIL, HSIL and cancer development.

Key words: human papilomavírus; cervical intraepithelial lesions; oxidative stress; single nucleotide variation; molecular diagnosis; MnSOD; Val16Ala.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	O genoma do HPV	16
Figura 2 -	A infecção pelo HPV no contexto das lesões	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	<i>Celsius grade</i>
μM	Micromolar
Ala	<i>Alanine</i> (Alanina)
ATP	adenosina trifosfato
Bp	<i>Base pairs</i> (Pares de base)
C	<i>Cytosine</i> (Citosina)
CA	California
CAT	Catalase
CDK1	<i>Cyclin-dependent kinase 1</i> (Ciclina B)
CEP/UEL	<i>Institutional Ethics Committee Involving Humans of the State University of Londrina</i>
Cismepar	<i>Consortium of Health of the Middle Paranapanema</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DNTP	<i>Deoxynucleotide</i>
E	Early
E2F	<i>E2 promoter-binding factor</i> (Fator de ligação do promotor E2)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ERE	Espécie reativa de enxofre
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERRO	<i>Reactive oxygen specie</i> (Espécie reativa de oxigênio).
G2	<i>Gap2</i>
GPx	Glutathiona peroxidase
H	<i>Hour</i>
HeLa	<i>Cell line of cervical adenocarcinoma containing integrated HPV18 genome</i>
HCl	<i>Hydrochloride</i>
HPV	<i>Human Papillomavirus</i> (Papilomavírus Humano)
HPV-AR	Papilomavírus Humano de alto risco
HPV-BR	Papilomavírus Humano de baixo risco
HPV-RI	Papilomavírus Humano de risco indeterminado
H2O2	<i>Hydrogen peroxide</i> (Peróxido de hidrogênio)
HSIL	<i>Low-grade squamous intraepithelial lesions</i>

Inc	<i>Incorporation</i>
INCA	<i>National Cancer Institute</i> (Instituto Nacional do Câncer)
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
KCl	<i>Potassium chloride</i>
L	Late
LCR	<i>Long control region</i>
LIEAG	Lesões intraepiteliais escamosas de alto grau
LIEBG	Lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau
LSIL	<i>High-grade squamous intraepithelial lesions</i>
MA	<i>Massachusetts</i>
MgCl ₂	<i>Magnesium chloride</i>
ml	<i>Mililiter</i>
mM	Milimolar
Mn	Manganês
MnSOD	<i>Superoxide dismutase manganese-dependent</i> (Superóxido Dismutase dependente de manganês)
MTS	<i>Mitochondrial Targeting Sequence</i>
NCR	<i>non-coding region</i>
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
nM	<i>Nanometer</i>
nM	<i>Nanomolar</i>
ng	Nanogram
O ₂	Oxigênio
O ₂ -	Radical superóxido
OH	<i>Hydroxyl radical</i> (Radical hidroxila)
ORF	Fases abertas de leitura
Pb	Pares de base
p53	Proteína 53
pRb	Proteína do retinoblastoma
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia de polimerase)
pH	<i>Potential of hydrogen</i>
PR	<i>State of Parana</i>
RFPL	<i>Restriction for fragment length polymorphism</i> (Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição)

ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SNV	<i>Single nucleotide variance</i> (Variantes de nucleotídeo único)
SOD	<i>Superoxide dismutase</i> (Superóxido Dismutase)
SOD1	<i>Superoxide dismutase 1</i> (Superóxido Dismutase 1)
SOD2	<i>Superoxide dismutase 2</i> (Superóxido Dismutase 2)
SOD3	<i>Superoxide dismutase 3</i> (Superóxido Dismutase 3)
SUS	Sistema Único de Saúde
T	<i>Thymine</i> (Timina)
TE	<i>Tris-EDTA</i>
TM	<i>Trade Mark</i>
U	<i>Unit</i>
UEL	<i>State University of Londrina</i>
URR	<i>Upstream regulatory region</i>
USA	<i>United States of America</i>
V	<i>Volts</i>
Val	<i>Valine</i> (Valina)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	O PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)	15
1.1.1	Estrutura Viral	15
1.1.1.1	Proteínas virais	16
1.1.2	Tipos Virais	18
1.1.3	Transmissão do HPV e Lesões Cervicais	18
1.2	O ESTRESSE OXIDATIVO	20
1.2.1	O Estresse Oxidativo no Contexto das Lesões	21
1.2.2	O Sistema Antioxidante	21
1.2.2.1	A Superóxido Dismutase (SOD) e sua Função Antioxidante	22
1.3	VARIANTES DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNVS)	22
1.3.1	SNV RS4880 do Gene SOD2	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
4	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	34
4.1	ARTIGO	34
5	CONCLUSÃO	56
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
	APÊNDICES	60
	APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido	60
	APÊNDICE B – Questionário socioepidemiológico	61
	ANEXOS	63
	ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa	63

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 O PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

O Papilomavírus Humano (HPV) é a Infecção Sexualmente Transmissível (IST) mais comum no mundo, afetando tanto homens quanto mulheres, cujas manifestações clínicas vão desde condilomas até o câncer (ROSA *et al.*, 2009; DUNNE; PARK, 2013; EGAWA *et al.*, 2015).

Desde seu descobrimento, já foram descritos mais de 200 tipos do vírus, classificados de acordo com seu potencial carcinogênico em HPVs de alto risco (HPV-AR), risco indeterminado (HPV-RI) e baixo risco (HPV-BR), todos eles podem induzir lesões benignas (PETRY, 2014; ARALDI *et al.*, 2018). Destes, os HPVs-AR são associados ao desenvolvimento de lesões malignas em diversas regiões do corpo, como: vulva (VAN DER AVOORT *et al.*, 2006), vagina (FERREIRA *et al.*, 2008), ânus (ABRAMOWITZ *et al.*, 2011), pênis (RUBIN *et al.*, 2001), cabeça e pescoço (SYRJÄNEN *et al.*, 2017).

Apesar de não ser exclusivo, o HPV é fator essencial para o desenvolvimento do câncer de colo de útero (ROSA *et al.*, 2009). O terceiro tipo de câncer que mais acomete mulheres no Brasil e o quarto em relação a taxa de mortalidade segundo o INCA (2020), o que representa um problema de saúde pública a nível mundial (TORRE *et al.*, 2015).

1.1.1 ESTRUTURA VIRAL

O HPV é membro da família *Papillomaviridae* (CAMARA, *et al.*, 2003). Esta família é constituída por vírus não-envelopados com DNA circular de dupla fita contendo aproximadamente 8000 pares de base (pb) organizadas em 8 fases abertas de leitura (ORFs) divididas em duas regiões: a região *early* (E), de expressão precoce, que codifica as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7, envolvidas em atividades enzimáticas, persistência do genoma, replicação do DNA, apoptose e instabilidade dos cromossomos, e a região *late* (L), de expressão tardia, que codifica as proteínas L1 e L2, que compõem o capsídeo viral, essenciais para a fabricação de novos vírions (CHEN *et al.*, 2005; ZUR HAUSEN, 1996; DE SANJOSÉ *et al.*, 2018). Além das ORFs, o vírus possui um segmento longo não-codificante chamado de *long control region*

(LCR) ou *upstream regulatory region* (URR) que controlam a transcrição e replicação do DNA viral (DOORBAR *et al.* 2012) (Figura 1).

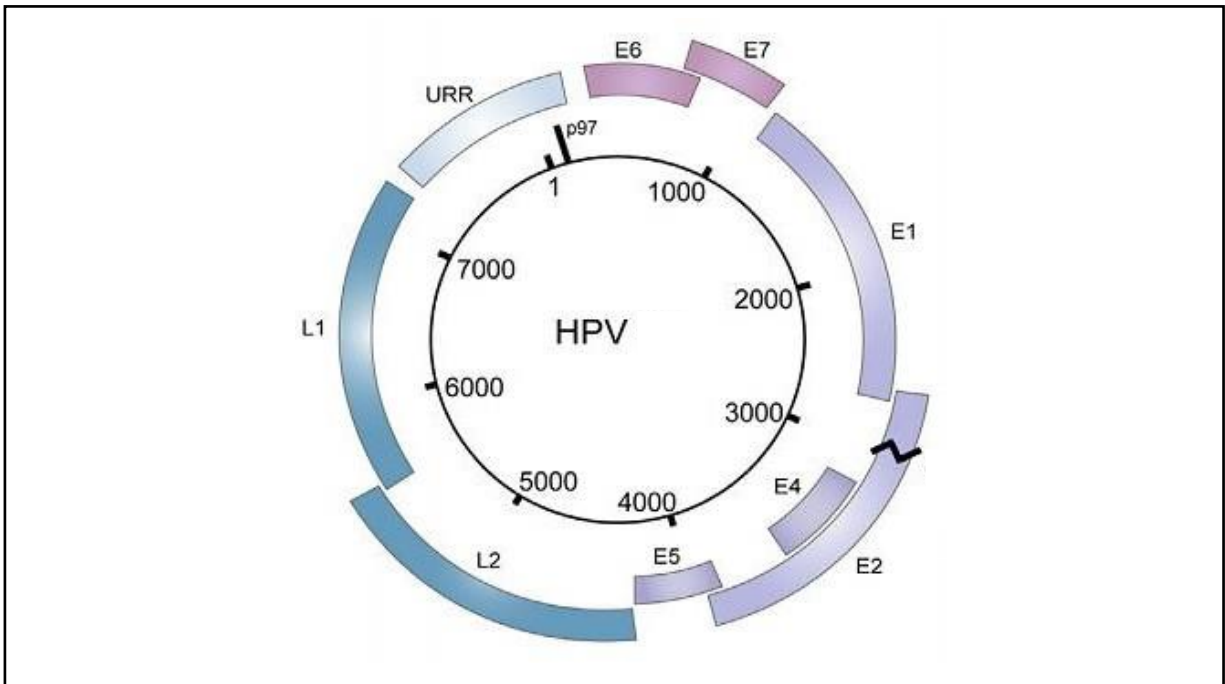


Figura 1: O genoma do HPV. Adaptado de BERTI *et al.*, 2017.

1.1.1.1 PROTEÍNAS VIRAIS

Com relação às proteínas de expressão precoce, E1 e E2 estão envolvidas com o início da replicação viral e podem estimular a replicação do DNA quando interagem entre si (ZUR HAUSEN, 1996). Para isso, E1 depende de adenosina trifosfato (ATP) para desempenhar função de helicase e E2 atua principalmente no recrutamento de E1 ao sítio de origem de replicação e também como importante reguladora da transcrição da região de expressão precoce, ativando se estiver em baixos níveis ou reprimindo quando em grandes quantidades (HEBNER; LAIMINS, 2006). Em estágios mais avançados da infecção, ocorre uma ruptura da expressão de E2, interrompendo sua expressão e levando, por conseguinte, a desregulação dos genes de expressão precoce, incluindo E6 e E7, bem como um aumento da capacidade proliferativa que favorece a progressão tumoral (MOODY; LAIMINS, 2010).

A participação da proteína E4 ainda não foi completamente elucidada, porém, sugere-se que ela confira eficiência na amplificação do genoma viral por contribuir com a síntese de novas partículas através do sequestro de CiclinaB/*Cyclin-dependent kinase 1* (CDK1) para o citoplasma, mantendo a célula na fase *gap 2* (G2) do ciclo celular, colaborando com a síntese de novos vírions, assim como, parece facilitar a

liberação/transmissão dos vírions recém formados através da desestruturação da rede de citoqueratina das células (DOORBAR, 2013). Além destas, tem sido relatado o efeito de cooperação de E4 e E2, como uma sobreposição funcional, além da possibilidade de que E4 atue para influenciar a atividade E2 por variar a quantidade de E2 disponível na célula (DAVY *et al.*, 2009).

A proteína E5, conservada em diversos tipos de HPV, parece estar relacionada com os estágios iniciais da infecção, além de estar relacionada aos oncogenes no processo de carcinogênese (ZUR HAUSEN, 1996). Além disso, E5 mostrou induzir a formação de poros (CONRAD *et al.*, 1993) e anular a apoptose (KABSCH *et al.*, 2004) e também foi proposta a função de amplificação do genoma (YAJID *et al.*, 2017).

As proteínas E6 e E7 estão envolvidas com tumores anogenitais malignos (FRAZER *et al.*, 1998). São consideradas as principais proteínas virais transformadoras, elas têm como alvo uma série de reguladores negativos do ciclo celular, principalmente os supressores tumorais proteína 53 (p53) e proteína do retinoblastoma (pRb), respectivamente (FEHRMANN *et al.*, 2003; BRIANTI *et al.*, 2017).

Ao se ligar com a proteína celular p53, a proteína E6 promove sua degradação pelo proteassoma, ocasionando a perda do reparo de dano do DNA (THOMAS *et al.*, 1999). A p53 atua interrompendo o ciclo celular, para que o DNA danificado seja reparado ou induzindo a apoptose, assim, com a sua degradação não havendo reparo ao DNA e conseqüentemente, levando a mutações celulares (STREET; DELGADO, 1995). Por sua vez, a oncoproteína E7 se liga à pRb, resultando na inativação funcional e degradação da pRb (HOPPE-SEYLER *et al.*, 2018). Essa ligação leva à liberação do fator de transcrição E2F, promovendo a entrada no ciclo celular e ativando a proliferação do DNA viral (ZUR HAUSEN, 1996). Assim, durante o ciclo de vida viral, E6 e E7 facilitam a manutenção estável de epissomas virais e estimulam células diferenciadas a entrarem na fase S (síntese) (FERRARO *et al.*, 2011).

As proteínas localizadas em regiões de expressão tardia, L1 e L2, também denominadas proteínas estruturais, são responsáveis pela formação do envoltório viral (ZUR HAUSEN, 1996). A L1 é o elemento estrutural primário, contendo 360 cópias desta proteína organizadas em 72 capsômeros, a L2 é o componente menor

do capsídio, presente no centro dos capsômeros, e ambas as regiões garantem maior infectividade ao HPV (DOORBAR, 2006).

Ainda, existem duas regiões não-codificantes compõem a estrutura viral: *non-coding region* (NCR), uma região curta localizada entre E5 e L2, e *long control region* (LCR), uma região longa que separa as regiões E e L, contendo os elementos promotores e reguladores iniciais envolvidos na transcrição e na replicação do DNA viral (CORNET *et al.*, 2012) (Figura 1).

1.1.2 TIPOS VIRAIS

Mais de 200 tipos de HPV já foram sequenciados completamente desde a sua descoberta nos anos 80 (EGAWA; DOORBAR, 2017). No entanto, apesar da ampla gama de tipos difundidos na população, apenas uma pequena parte das mulheres infectadas pelo HPV desenvolve o câncer (NAKAGAWA *et al.*, 2010). Um dos motivos para isso aconteça, é o fato dos tipos de HPV não terem o mesmo potencial oncogênico (FARIDI *et al.*, 2011). Os tipos virais são divididos em duas categorias, classificadas de acordo com a associação do vírus ao desenvolvimento de cânceres: os de baixo risco oncogênico e os de alto risco oncogênico (MUÑOZ *et al.*, 2003).

Todos os HPVs podem induzir lesões proliferativas benignas (FERRARO *et al.*, 2011). No entanto, 12 tipos virais estão relacionados com as neoplasias malignas, são os tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58,59, 68, 73 e 82 (HPVs de alto risco – HPV-AR) (MUÑOZ *et al.*, 2003). Destes, os tipos 16 e 18 se destacam e estão relacionados com dois terços de todos os cânceres cervicais, bem como aos de cânceres de vulva, vagina, pênis, ânus, orofaringe e pele (PETRY, 2014; ARALDI *et al.*, 2018). Com relação aos tipos classificados como baixo risco (HPVs-BR), os mais incidentes são: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72 e 81, destes, os mais comuns são os tipos 6 e 11, que podem ser encontrados em 90% dos casos de condilomas acuminados, também conhecidos como verrugas genitais (NAKAGAWA *et al.*, 2010).

1.1.3 TRANSMISSÃO DO HPV E LESÕES CERVICAIS

A transmissão do HPV ocorre pelo contato direto entre pele e mucosas, podendo ser pele-pele, pele-mucosas ou mucosa-mucosa e devido a via de transmissão comum, diversos tipos de HPV podem ser transmitidos ao mesmo tempo (SCHIFFMAN *et al.*, 2007). A alta incidência das infecções pelo HPV na região cervical

feminina, deve-se, primordialmente, ao tropismo do vírus pelo epitélio escamoso estratificado, infectando as células da camada basal deste epitélio através de micro lesões pré-existentes (ROSA *et al.*, 2009; LETO *et al.*, 2011). Após a infecção, o vírus pode integrar seu material genético à célula hospedeira se instalando no núcleo sob forma epissomal (FERNANDES *et al.*, 2015). Desta forma, genoma do vírus é amplificado e novas partículas são formadas para a propagação da infecção (SOUZA *et al.*, 2015) (Figura 2).

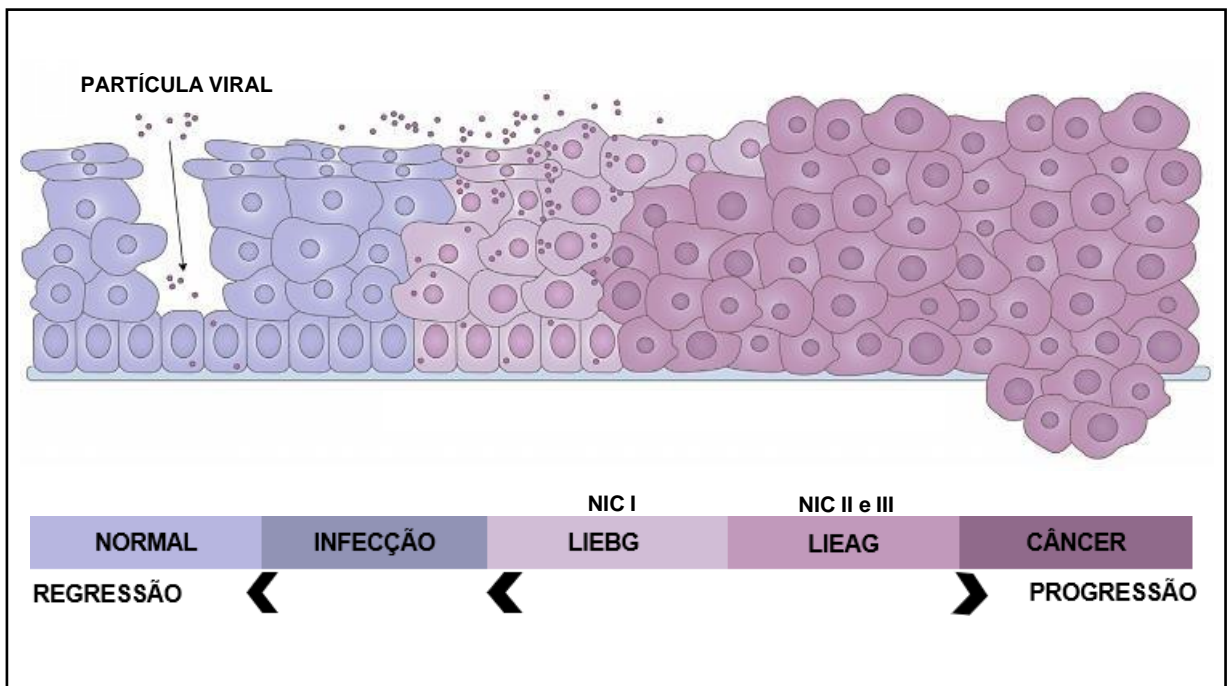


Figura 2: A infecção pelo HPV no contexto das lesões. Adaptado de BERTI *et al.*, 2017.

Na cérvix uterina, o vírus pode ser eliminado, permanecer num estado latente ou provocar lesões (ocorre numa minoria das mulheres) (BURD, 2003). Tais lesões podem ser classificadas de Neoplasia Intraepitelial Cervical 1 (NIC1) a NIC3 de acordo com a atipia epitelial encontrada no exame histológico (classificação de Richart, 1967), ou seja, o quão substituído está o epitélio estratificado normal por epitélio basal ativo mitoticamente (FONSECA *et al.*, 2012). A NIC 1 compreende atipias coilocitóticas, que são evidências histológicas da infecção por HPV, e displasia leve; a NIC 2 é considerada uma displasia moderada e a NIC 3, por sua vez, inclui a displasia grave e o carcinoma *in situ* (SCHIFFMAN *et al.*, 2007).

Outro sistema de classificação utilizado é o sistema de Bethesda (2001), no qual as lesões são divididas em lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau

(LIEBG) correspondendo a NIC 1 e as lesões intraepiteliais de alto grau (LIEAG) que abrangem NIC 2 e NIC 3 (BRASIL, 2012) (Figura 2).

Associando-se a prevalência do HPV à prevalência do câncer de colo de útero, prediz-se que na grande maioria dos casos o sistema imunológico é eficaz no combate da infecção viral, impedindo que as lesões evoluam para os estágios mais avançados (BURD, 2003). No entanto, existem alguns cofatores que podem levar a persistência da infecção, ocasionando a evolução da lesão e o desenvolvimento do câncer, são eles: fatores socioeconômicos, predisposição genética, imunossupressão, uso de contraceptivos, terapia de reposição hormonal e tabagismo (TONG *et al.*, 2009).

Além dos fatores de risco citados acima, evidências apontam um papel importante do estresse oxidativo no desenvolvimento deste tipo de câncer, ele faz com que o vírus persista no local levando a iniciação e transformação maligna das células (BORGES *et al.*, 2018; EBRAHIMI *et al.*, 2018). A literatura aponta evidências da associação do estresse com diversos tipos de câncer, incluindo o câncer cervical, desempenhando um papel importante na carcinogênese induzida pelo HPV (PRECI *et al.*, 2021).

1.2 O ESTRESSE OXIDATIVO

As espécies reativas de oxigênio são produtos gerados em consequência de reações metabólicas nas mitocôndrias de células eucarióticas, as quais utilizam de oxigênio para a obtenção de energia no processo de respiração aeróbia, processo que consiste em moléculas de carbono e hidrogênio com a participação do O₂ (SOSA *et al.*, 2013). Essas espécies geradas, normalmente são neutralizadas pela defesa antioxidante, que atrasa ou inibe a oxidação das moléculas (SIES, 1997).

No entanto, quando ocorre um desbalanço entre as espécies reativas produzidas (oxidantes) e os antioxidantes temos o fenômeno chamado de estresse oxidativo (HALLIWELL, 2007). Este por sua vez pode gerar danos às células, alterando e danificando muitas moléculas, incluindo DNA, lipídios e proteínas (VAN DER POL *et al.*, 2019). O estresse oxidativo está intimamente envolvido em processos degenerativos agudos e crônicos, como envelhecimento (MIYACHI, 1995) e o câncer (VESKOUKIS *et al.*, 2011).

Como resultado do estresse oxidativo, são produzidos compostos altamente reativos, os radicais livres ou oxidantes, que são definidos como moléculas ou

fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons não pareados em seus orbitais externos (DI MEO; VENDITTI, 2020). Estes podem ser classificados com base no elemento pelo qual se derivam, a exemplo das espécies reativas de oxigênio (EROs) espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e das espécies reativas de enxofre (EREs) (CARROCHO; FERREIRA, 2013; MARTELLI; NUNES, 2014).

1.2.1 O ESTRESSE OXIDATIVO NO CONTEXTO DAS LESÕES

A análise histopatológica de lesões induzidas por HPV exibem um aumento de infiltrado inflamatório, a persistência da infecção favorece a inflamação crônica, a qual pode induzir um desequilíbrio entre moléculas pró-oxidantes e antioxidantes (BOCCARDO, LEPIQUE, VILLA, 2010). O processo inflamatório pode levar, também, a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- α e IF- γ , os quais ativam proteínas quinase que medeiam a sinalização para a formação de radicais livres (BARTSCH, NAIR, 2006).

Os radicais livres podem causar danos à célula e quando associados com a persistência da infecção pelo HPV, podem influenciar na progressão das lesões precursoras do câncer cervical e interagir com o processo carcinogênico por meio das vias de transdução de sinais e da modulação da transcrição gênica (DE MARCO, 2013).

Sugere-se que dois tipos diferentes de mecanismos cooperativos ocorram entre estresse oxidativo e o HPV no desenvolvimento das lesões e evolução para o câncer: 1) a atividade genotóxica do estresse oxidativo e a instabilidade genômica induzida pelo HPV concorrem de forma independente para a geração do dano molecular necessário para o surgimento de clones neoplásicos, como uma co-carcinogênese; e 2) o estresse oxidativo especificamente interage com um ou mais estágios moleculares de iniciação neoplásica e/ou progressão induzida pela infecção por HPV (DE MARCO, 2013).

O HPV tem habilidade de se adaptar às condições de estresse oxidativo, modulando a defesa antioxidante enzimática responsável por diminuir e/ou inibir os danos causados pelos oxidantes (BARBOSA *et al.*, 2010; CALAF *et al.*, 2018).

1.2.2 O SISTEMA ANTIOXIDANTE

Os efeitos danosos dos oxidantes podem ser neutralizados pelo sistema antioxidante, que atua em diferentes estágios do processo oxidativo, como diminuindo

ou removendo as concentrações malélicas das espécies reativas como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o superóxido (GUTTERIDGE, 1995; SALIM, 2017). O sistema antioxidante pode ser dividido em não-enzimático e enzimático ou exógeno e endógeno, respectivamente (BARBOSA *et al.*, 2010).

A exemplo da defesa não-enzimática temos o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E), a glutathiona, os carotenoides e os flavonoides, que são advindos principalmente da dieta, através de alimentos, como frutas, vegetais, cogumelos, cereais, flores, bebidas e especiarias, e de ervas medicinais tradicionais (CAI *et al.*, 2004). Destes antioxidantes, destacam-se os carotenoides e flavonoides, que possuem efeitos anti-inflamatórios, antibacterianos, antivirais, antienvhecimento e anticâncer (XU *et al.*, 2017).

A defesa enzimática é constituída pela superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (GRIENGLING *et al.*, 2000). Com destaque para a SOD, uma enzima que faz parte da primeira linha de defesa antioxidante contra o estresse oxidativo nas células, com crítico impacto na manutenção nos níveis das espécies reativas (WANG *et al.*, 2018).

1.2.2.1 A SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) E SUA FUNÇÃO ANTIOXIDANTE

A superóxido dismutase (SOD) é responsável pela dismutação do íon superóxido ($\cdot O_2^-$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (BRESCIANI *et al.*, 2015). O peróxido de hidrogênio é menos reativo e pode posteriormente ser utilizado pelas células ou eliminado através de outras enzimas antioxidantes (BIRBEN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2017).

A SOD pode ser encontrada em três diferentes isoformas: superóxido dismutase cobre-zinco, que é codificada pelo gene SOD_1 , superóxido dismutase extracelular, codificada pela SOD_3 e, por último, a superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD), a qual apresenta um átomo de manganês (Mn) em seu sítio ativo (FATTMAN *et al.*, 2003). A MnSOD também é conhecida como superóxido dismutase 2 (SOD_2), codificada pelo gene de mesmo nome, é a maior enzima antioxidante localizada na mitocôndria, responsável por catalisar a conversão de radicais superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que posteriormente são convertidos em água pela catalase e pela glutathiona peroxidase (TONG *et al.*, 2009; RABELO-SANTOS *et al.*, 2018).

1.3 VARIANTES DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNVs)

Os polimorfismos genéticos são o tipo mais comum de variação genética em seres humanos, cuja variação mais comum é denominada de polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês, *single nucleotide variant* (SNV)) e consiste na troca de um único nucleotídeo na sequência de DNA (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2004). São alterações herdadas de pais para seus descendentes e estão presentes em 1% ou mais da população e ocorrem, em média, a cada 300 nucleotídeos, sugerindo a existência de 10 milhões de SNV no genoma humano que podem alterar a produção ou a função de uma proteína, modificando toda a resposta do microambiente que ela está inserida (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2004; KARKI *et al.*, 2015).

1.3.1 SNV RS4880 DO GENE SOD2

O gene *SOD₂* está localizado no cromossomo 6 e consiste em um promotor e cinco éxons interrompidos por quatro íntrons, e várias SNVs podem ser observadas em regiões distintas do gene *SOD₂*, e uma das mais estudadas é a SNV rs4880 (ou Val16Ala), localizada no éxon 2 deste gene, na posição g.74690 (*SOD₂* RefSeqGene: NG_008729.3) e caracterizada pela substituição de uma timina (T) por uma citosina (C) no códon 16 (GTT→GCT), ocasionando a troca de uma valina (Val) por uma alanina (Ala) na proteína (NIKIC *et al.*, 2018). Esta variação se encontra na região que codifica a *mitochondrial targeting sequence* (MTS), a qual altera a estrutura do peptídeo e afetando a translocação e maturação da proteína na matriz mitocondrial (TAŞ *et al.*, 2019).

Sutton *et al.* (2005) sintetizou as variantes Val-MnSOD e a Ala-MnSOD em hepatócitos de rato, *in vitro*, e observou a importação das proteínas precursoras em mitocôndrias isoladas. O precursor Val-MnSOD, que possui o MTS em formato de folha beta-pregueada, ficou parcialmente estagnado na membrana interna da mitocôndria, enquanto o precursor Ala-MnSOD, com o MTS em formato de alfa-hélice, foi total e rapidamente introduzido na mitocôndria.

Uma maior eficiência da Ala-MnSOD gera altos níveis de peróxido de hidrogênio, o qual atravessa facilmente as membranas mitocondriais, atingindo o citoplasma da célula, aumentando assim potencialmente alguns níveis de EROs, como o radical hidroxila (•OH) (JOBIM *et al.*, 2019). Além disso, em comparação com a variante Val-MnSOD, variante Ala-MnSOD mostra aumento da atividade enzimática (XU *et al.*, 2015).

Esse polimorfismo, especificamente o genótipo CC, está relacionado a alguns tipos de cânceres, como de pulmão (LI *et al*, 2014), colorretal (STOEHLMACHER *et al.*, 2002) e de mama (JABIR; HOIDY, 2018). Em relação ao câncer cervical, mulheres coreanas portadoras do alelo C juntamente com um estado antioxidante de baixo nível tiveram maior suscetibilidade para a carcinogênese cervical do que mulheres TT (TONG *et al.*, 2009). No entanto, não há na população brasileira estudos avaliando o papel desta SNV na infecção pelo HPV, no desenvolvimento de lesões pré-malignas de baixo, alto grau e no câncer cervical.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação do polimorfismo rs4880 do gene *SOD₂* com o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e com o câncer de colo de útero causados pela infecção pelo HPV nas mulheres atendidas pelo sistema único de saúde (SUS) na região Norte do Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar o HPV em mulheres atendidas pelo SUS na região norte do Paraná;
- Avaliar a frequência genotípica do polimorfismo rs4880 da *SOD₂* em mulheres não infectadas e infectadas pelo HPV;
- Verificar se existe a associação entre as características socioepidemiológicas com a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de lesões;
- Avaliar a frequência em que o polimorfismo rs4880 da *SOD₂* é encontrado em mulheres infectadas pelo HPV sem lesão, com lesão de baixo grau, lesão de alto grau e o câncer de colo de útero;
- Verificar se existe a associação entre o polimorfismo rs4880 da *SOD₂* com a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de lesões;
- Analisar se há associação entre o polimorfismo rs4880 da *SOD₂* com a infecção pelo HPV e a incidência câncer de colo de útero.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOWITZ, L. et al. Human papillomavirus genotype distribution in anal cancer in France: the EDiTH V study. **International Journal of Cancer**, v.129, n.2, p.433–439, set. 2011.

ARALDI, R. P. et al. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.106, p.1537–1556, jun.2018.

BALASUBRAMANIAN, S. P. et al. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **European journal of surgical oncology**, v.30, n.6, p.593-601, ago. 2004.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, p.629-643, 2010.

BARTSCH, H., NAIR, J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. **Langenbeck's Archives of Surgery**. v. 391, n.5, p. 499–510, ago. 2006.

BERTI, F. C. B. et al. The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v.34, p.1-13, mar. 2017.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**. v.5, p.9–19, jan. 2012.

BOCCARDO, E., LEPIQUE, A. P., VILLA, L. L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis**. v. 31, n.11, p. 1905–1912, set. 2010.

BORGES, B. E. S. et al. Infecção por papilomavírus humano e lesões precursoras do câncer cervicouterino em Ribeirinhas da Amazônia: avaliação da relação com marcadores de estresse oxidativo. **Einstein**, v.16 n.3, p.1-7, ago. 2018

BRASIL. **Estimativa 2020: Incidência do Câncer no Brasil**. INCA, 2020.

BRASIL. **Nomenclatura brasileira para laudos citopatológicos cervicais**. INCA, 2012.

BRESCIANI, G.; DA CRUZ, I. B.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. **Advances in clinical chemistry**, v.68, p.87-130, jan. 2015.

BRIANTI, P.; DE FLAMMINEIS, E.; MERCURI, S. R. Review of HPV-related diseases and cancers. **The new microbiologica**, v.40, n.2, p.80-85, abr. 2017.

BURD, E. M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Clin Microbiol Rev.**, v.16, n.1, p.1-17, jan. 2003.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74(17), p. 2157-84, mar. 2004.

CALAF, G. M. et al. Oxidative stress in female cancers. **Oncotarget**, v.9, n.34, p. 23824-23842, mai. 2018.

CAMARA, G. N. N. L. et al., Os papilomavírus humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. **Universitas Ciências da Saúde**, v.1, n.1, p.149-158, 2003.

CARROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.15-25, 2013.

CHEN, Z. et al. Selection in Human Papillomavirus Type 16 Lineages Based on Complete Genome Analyses. **Journal of Virology**, v.79, n.11, p.7014 – 7023, jun. 2005.

CONRAD, M.; BUBB, V. J.; SCHELEGEL, R.; The Human Papillomavirus Type 6 and 16 E5 Proteins Are Membrane-Associated Proteins Which Associate with the 16 Kilodalton Pore-Forming Protein. **Journal of virology**, v.67, n.10, p.6170-6178, jul. 1993.

CORNET, I. et al. Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. **Journal of virology**, v.86, n.12, p.6855-61, jun. 2012.

DAVY, C. et al. A novel interaction between the human papillomavirus type 16 E2 and E1^{E4} proteins leads to stabilization of E2. **Virology**, v.394, n.2, p.266–275, ago. 2009.

DE MARCO, F. Oxidative stress and HPV carcinogenesis. **Víruses**, v.5, n.2, p.708-31, fev. 2013.

DE SANJOSÉ, S.; BROTONS, M.; PAVÓN, M. A. The natural history of human papilomavírus infection. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v.47, p.2-13, fev. 2018.

DI MEO, S. VENDITTI, P. **Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants**, v.2020, p.1-32, abr. 2020.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomavíruses. **Vaccine**, v.305, p.F55-F70, nov. 2012.

DOORBAR J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin. Sci.**, v. 110, p. 525-541, 2006.

DOORBAR, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, v.445, p.80–98, out. 2013.

DUNNE, E. F.; PARK, I. U. HPV and HPV-Associated Diseases. **Infect. Dis. Clin. N. Am.** v.27, n.4, p.765–778. dez. 2013.

EBRAHIMI, S.; SOLTANI, A.; HASHEMY, S. I. Oxidative stress in cervical câncer pathogenesis and resistance to therapy. **Journal of cellular biochemistry**, nov. 2018.

EGAWA, N.; DOOBAR, J. The low-risk papillomaviruses. **Virus Research**. v.231, n.2 p.119-127, mar. 2017.

EGAWA, N. et al. Human papillomaviruses; Epithelial tropisms, and the development of neoplasia. **Viruses**, v.7, n.7, p.3863–3890, jul. 2015.

FARIDI, R. et al. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. **Virol. J.** v.8, n.1, p.269-270, jun. 2011.

FATTMAN, C. L.; SCHAEFER, L. M.; OURY, T. D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. **Free radical biology & medicine**, v.35, n.1, p. 236-56, ago. 2003.

FEHRMANN, F.; KLUMPP, D. J.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. **Journal of Virology**, v.77, n.5, p.2819–2831, mar. 2003.

FERNANDES, José Veríssimo et al. Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (Review). **Oncology Letters**, v.9, n.3, p. 1015–1026, jan. 2015.

FERRARO, C. T. L. et al. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.47 n.4, p.451-459, ago. 2011.

FERREIRA, M. et al. HPV DNA detection and genotyping in 21 cases of primary invasive squamous cell carcinoma of the vagina. **Modern Pathology**, v.21, n.8, p.968–972, mai. 2008.

FONSECA, F. V.; TOMASICH F. D. S.; JUNG, J. E. Neoplasia Intraepitelial Cervical: da Etiopatogenia ao Desempenho da Tecnologia no Rastreo e no Seguimento. **DST J. bras. Doenças. Sex. Transm.**, v.24, n.1, p.53-61, mai. 2012.

FRAZER, I. H. The role of the immune system in anogenital human papillomavirus. **The Australasian Journal of Dermatology**, v.39, p.5-7, out. 1998.

GRIENDLING, K. K. et al. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v.20, v.10, p.2175-83, out. 2000.

GUTTERIDGE, J. M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical chemistry**, v.41, p.1819-28, dez.1995.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society transactions**, v.35, p.1147-50, nov. 2007.

HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Reviews in Medical Virology**, v.16, n.2, p.83–97, mar. 2006.

HOPPE-SEYLER, K. et al. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. **Trends in microbiology**, v.26, n.2 p.158-168, fev. 2018.

JABIR, F. A.; HOIDY, W. H. Pharmacogenetics as Personalized Medicine: Association Investigation of SOD2 rs4880, CYP2C19 rs4244285, and FCGR2A rs1801274 Polymorphisms in a Breast Cancer Population in Iraqi Women. **Clinical breast cancer**, v.18, n.5, p. e863-e868, out. 2018.

JOBIM, M. L. et al. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance differentially modulates the keratinocytes cell line (HaCaT) oxidative metabolism via Keap1-Nrf2 redox signaling pathway. **Molecular biology reports**, ago. 2019.

KABSCH, K. et al. The HPV-16 E5 protein inhibits TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in human keratinocyte raft cultures. **Intervirolgy**, v.47, n.1, p.48–56, ago. 2004.

KARKI, R. et al. Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. **BMC medical genomics**, v.15, p.8-37, jul. 2015.

LETO, M. G. P. et al. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **An. Bras. Dermatol.**, v.86 n.2, p.306-317, mar. 2011.

LI, N.; HUANG, H. Q.; ZHANG, G. S. Association between SOD2 C47T polymorphism and lung cancer susceptibility: a meta-analysis. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v.35, n.2, p. 955-9, fev. 2014.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Cienc. Cult.**, v.66, n.3, p.54–57, set. 2014.

MIYACHI, Y. Photoaging from an oxidative standpoint. **Journal of dermatological science**, v.9, n.2, p.79-86, mar. 1995.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v.10, n.8, p.550–560, jul. 2010.

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **The New England journal of medicine**, v.348, n.6, p.518-27, fev. 2003.

NAKAGAWA, J. T. T.; SCHIRMER, J.; BARBIERI, M. Vírus HPV e câncer de colo de útero. **Rev. bras. enferm.** v.63, n.2, p.307-311, abr. 2010.

NIKIC, P. et al. Association between GPX1 and SOD2 genetic polymorphisms and overall survival in patients with metastatic urothelial bladder cancer: a single-center study in Serbia. **JBUON**. v.23, n.4, p.1130-1135. 2018.

PETRY, K. U. HPV and cervical cancer. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v.74, p.59–62, ago. 2014.

PRECI, D. P. et al. Oxidative damage and antioxidants in cervical cancer. **Int. J. Gynecol. Cancer**. v.31, n.2, p.265-271, fev. 2021.

RABELO-SANTOS, S. H. et al. Strong SOD2 expression and HPV-16/18 positivity are independent events in cervical cancer. **Oncotarget**, v.9, n.31, p.21630-21640, mar. 2018.

ROSA, M. I. et al. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. **Cad. Saúde Pública**, v.25, n.5, p.953-964, mai. 2009.

RUBIN, M. A. et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: Evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. **American Journal of Pathology**, v.159, n.4, p.1211–1218, out. 2001.

SALIM, S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, 360, n.1, p. 201-205, jan. 2017

SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavírus and cervical cancer. **Lancet**, v.370, n.9590, p.890-90, set. 2007.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, n.82, v.2, p.291–295. 1997.

SOSA, V. et al. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing research reviews**, v.12, n.1, p.376-390. jan. 2013.

SOUZA, G.C. S. et al. Papilomavírus humano: biologia viral e carcinogênese. **Femina**, v.43, n.4, p.189-192. jul. 2015.

STOEHLMACHER, J. et al. The -9Ala/-9Val polymorphism in the mitochondrial targeting sequence of the manganese superoxide dismutase gene (MnSOD) is associated with age among Hispanics with colorectal carcinoma. **Oncology reports**, v.9, n.2, p.235-8, mar. 2002.

STREET, D.; DELGADO, G.; The Role of p53 and HPV in Cervical Cancer. **Gynecologic Oncology**, v.58, n.3, p.287-288, set. 1995.

SUTTON, A. et al. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. **Pharmacogenetics and Genomics**, v.15, n.5, p.311-319, mai. 2005.

SYRJÄNEN, S.; RAUTAVA, J.; SYRJÄNEN, K. HPV in head and neck cancer—30 years of history. **Recent Results in Cancer Research**, v.206, p.3–25, out. 2017.

- TAŞ, A. et al. Role of SOD2 Ala16Val polymorphism in primary brain tumors. **Biomedical reports**, v. 10, n.3, p.189-194, mar.2019.
- THOMAS, M.; PIM, D.; BANKS, L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. **Oncogene**, v.18, n.53, p.7690-7700, dez. 1999.
- TONG, S. Y. et al. Functional polymorphism in manganese superoxide dismutase and antioxidante status: their interactions on the risk of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. **Gynecologic oncology**, v.115, n.2, p.272-6, nov. 2009.
- TORRE; L. A. et al. Global Cancer Statistics, 2012. **CA a cancer J Clin** **65**, v.65, n.2, p.87-108, mar. 2015.
- VAN DER AVOORT, I. A. M. Vulvar Squamous Cell Carcinoma is a Multifactorial Disease Following Two Separate and Independent Pathways. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, v.25, n.1, p.22-29. jan. 2006.
- VAN DER POL, et al. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. **Eur. J. Heart Fail.**, v.21, n.4, abr. 2019.
- VESKOUKIS, A. S.; TSATSAKIS, A. M.; KOURETAS, D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. **Cell Stress and Chaperones**, v.17, p.11–21, sep. 2011.
- WANG, W. et al. SOD2 Facilitates the Antiviral Innate Immune Response by Scavenging Reactive Oxygen Species. **Viral immunology**, v.00, n.00, p.1-8. 2017.
- WANG, Y. et al. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. **J. Cell Biol.** v.217, n.6, p.1915–1928, jun. 2018.
- XU, D. P. et al. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resource. **International journal of molecular sciences**, v.18, n.1, p.96, jan. 2017.
- XU, Z. et al. SOD2 rs4880 CT/CC genotype predicts poor survival for Chinese gastric cancer patients received platinum and fluorouracil based adjuvant chemotherapy. **Am J. Transl. Res.**, v.7, n.2, p.401-410. 2015.
- YAJID, A. I. et al. Potential role of E4 protein in human papillomavirus screening: A review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.18, n.2, p.315–319, 2017.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomavírus infections – a major cause of human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1288, n.1996, p. 55-78, mai.1996.

4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

DEVELOPMENT OF CERVICAL INTRAEPITHELIAL LESIONS AND CERVICAL CANCER IS NOT INFLUENCED BY SOD2 RS4880 POLYMORPHISM

CURTI, R. R. J.¹; OLIVEIRA, K. B.²

Some of the more than 200 known HPV types are essential for cervical cancer development, the third type of cancer most incident in the female population. However, for the malignant transformation occur, some cofactors are needed, as the reactive oxygen species (ROS), which can be neutralized by the antioxidant system. The SOD2 enzyme, encoded by the same name gene, is found in mitochondria and is part of the first line of defense against oxidative stress damage. Genetic polymorphisms can act by altering the efficiency of the enzyme, among which the most studied is the *rs4880*. Thus, the purpose of the present study was to evaluate the association of this polymorphism with HPV infection and the development of low and high grade squamous intraepithelial lesions (LSIL and HSIL) and cervical cancer, in 407 women attended by the public health system in Brazil. HPV detection in cervical secretion samples was carried out by polymerase chain reaction (PCR) and blood sample were used for polymorphism genotyping through PCR followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP). PCR and restriction products were subjected to 10% polyacrylamide gel electrophoresis. HPV negative group (control) included 158 women and the HPV positive group (case) 249 women. The infected group was divided into No Lesion (n=90), LSIL (n=20), HSIL (n=67) and cervical cancer (n=72). The data found on socio-epidemiological characteristics and habits corroborated with data found in the literature. The distribution of genotypes in the control group was 51.9% women TC, 29.8% TT and 18.3% CC. In the case group, the distribution was 55.0% women TC, 26.1% TT and 18.9% CC. This is the first study evaluating the influence of SOD2 *rs4880* polymorphism on HPV infection, the development of cervical intraepithelial lesions and cervical cancer in a Brazilian population. Although additional studies are needed to corroborate the results, it was demonstrated that the alleles and genotypes of the *rs4880* polymorphism were neither associated with susceptibility to HPV infection nor with LSIL, HSIL and cancer development.

Keywords: Human papillomavirus. Cervical intraepithelial lesions. Oxidative stress. Single nucleotide variation. Molecular diagnosis. MnSOD. Val16Ala.

¹Laboratory of Molecular Genetics and Immunology, Department of Experimental Pathology, State University of Londrina, 86.057-970, Paraná, Brazil, (rafaelacurti@icloud.com).

²Laboratory of Molecular Genetics and Immunology, Department of Experimental Pathology, State University of Londrina, 86.057-970, Paraná, Brazil, (karen.brajao@gmail.com).

1. INTRODUCTION

Since its discovery, in the 80's (ROSA et al., 2009), the Human Papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted infection (DUNNE; PARK, 2013). More than 200 types are known, which are classified according to their carcinogenic potential, of these, the high-risk HPVs are associated with malignant lesions development (EGAWA; DOORBAR, 2017), at example of cancer in vulva (VAN DER AVOORT et al., 2006), vagina (FERREIRA et al., 2008), anus (ABRAMOWITZ et al., 2011), penis (RUBIN et al., 2001), head and neck (SYRJÄNEN et al., 2017). The HPV is an essential factor, but not exclusive, for the cervical cancer development, the third type of cancer that most affects women in Brazil and the fourth most common in women worldwide according to the INCA (2020). Thus, in addition to infection, some factors collaborate for the lesion's progression, as oxidative stress (BURD, 2003; PRECI et al., 2021) that occurs when there is an imbalance between oxidants and antioxidants (HALLIWELL, 2007) generating free radicals harmful to cells and if associated to the persistence of HPV infection, can induce the carcinogenic process through signal transduction pathways and gene transcription modulation (DE MARCO, 2013). Moreover, the HPV has the ability to adapt to oxidative stress conditions, modulating the enzymatic antioxidant defense, responsible for decreasing or inhibiting the damage caused by oxidants (BARBOSA et al., 2010; CALAF et al., 2018).

Among the enzymatic antioxidants, the isoform of superoxide dismutase manganese-dependent, also known as MnSOD or SOD₂, encoded by the gene of the same name, is the largest antioxidant enzyme located in the mitochondria, responsible for catalyzing the conversion of superoxide radicals to hydrogen peroxide (H₂O₂), which are subsequently converted to water by catalase and glutathione peroxidase (BIRBEN et al., 2012; WANG et al., 2017).

The SOD₂ gene is localized on chromosome 6 and consists in a promoter and five exons interrupted by four introns (ZELKO et al., 2002). Some SNVs can be observed in different regions of the SOD2 gene, one of the most studied is the SNV rs4880 (or Val16Ala), localized on exon 2, in the position g.74690 (SOD2 RefSeqGene: NG_008729.3) and is characterized by the replacement of a thymine (T) by a cytosine (C) at codon 16 (GTT→GCT), causing the exchange of a valine (Val) for an alanine (Ala) in the protein (NIKIC et al., 2018). This variation is found in the region that encodes the *mitochondrial targeting sequence* (MTS), which changes the structure of

the peptide, affecting the translocation and maturation of the protein in the mitochondrial matrix (TAŞ et al., 2019).

Sutton et al. (2005) synthesized the Val-MnSOD and Ala-MnSOD variants in rat hepatocytes, *in vitro*, and observed that the precursor Val-MnSOD, which has MTS in the form of a beta-pleated sheet, was partially stagnant in the inner membrane of the mitochondria, while the Ala-MnSOD precursor, with alpha-helix-shaped MTS, was quickly and completely introduced into the mitochondria, generating high levels of hydrogen peroxide, which easily crosses mitochondrial membranes, reaching the cell cytoplasm, potentially increasing some ROSs levels, as the hydroxyl radical (\bullet OH).

This variant, specifically the CC genotype, is related to some types of cancer, such as lung (LI et al, 2014), colorectal (STOEHLMACHER et al., 2002) and breast (JABIR, HOIDY, 2018). Regarding cervical cancer, Korean women with the C allele and low levels of antioxidants were more susceptible to cervical carcinogenesis than TT women (TONG et al., 2009). However, there are no studies in the Brazilian population evaluating the role of this SNV in HPV infection, in the development of low and high-grade premalignant lesions and in cervical cancer, which were evaluated in the context of this study.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 ETHICAL APPROVAL AND SAMPLE CHARACTERIZATION

The present study was approved by Institutional Ethics Committee Involving Humans at State University of Londrina, Londrina – Paraná (PR), Brazil (CEP/UEL 133/2012; CAAE 05505912.0.0000.5231). The study purpose and procedures were explained to all patients and written informed consent was obtained. The women enrolled in this case control-study were recruited in public health services in Londrina-PR, Brazil: the Intermunicipal Consortium of Health of the Middle Paranapanema (Cismepar), Clinical Hospital of the State University of Londrina, and from two basic health-care units. After sample collection, cytobrushes containing cervical cells were stored in 2 mL TE buffer (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA pH 8.0) at -20°C until DNA extraction. Peripheral blood was collected with EDTA as anticoagulant, and stored at 7°C. Structured questionnaire was applied concerning sociodemographic, reproductive and sexual behavioral data. Participants were stratified based on HPV

DNA presence or absence. Cervical cytology results were collected from medical records.

2.2 GENOMIC DNA EXTRACTION

Genomic DNA was obtained from cervical cytobrushes using DNAzol (Invitrogen™ Inc., Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, and from peripheral blood using Biopur Mini Spin Plus Kit (Biometrix®, Curitiba, PR, Brazil). DNA concentration was measured at 260 nm on a NanoDrop 2000c™ Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and purity was assessed by absorbance ratio measured at 260 nm and 280 nm.

2.3 HPV DETECTION

HPV was detected by Polymerase Chain Reaction (PCR) using the primers MY09 (5'-CGTCCMAARGGAWACTGATC-3') and MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'), which are designed to amplify a conserved region of approximately 450 bp in the HPV L1 gene (BAUER et al., 1991). Reaction conditions were 190 nM of dNTPs, 500 nM of each primer, 2 mM of MgCl₂, 1X of Buffer (200 mM Tris-HCL, 500 mM KCl), approximately 80 ng of DNA and 1.25 U of Taq polymerase (Invitrogen™), with an annealing temperature of 55°C. β-globin gene amplification (268 bp) was performed as an internal control, using primers GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') and PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3') (MARANGON et al., 2013) under the same conditions of HPV PCR. Reactions without template DNA were used as negative control to test for contamination, and DNA from HeLa cells, which are stably integrated with HPV18, was used as positive control. PCR products were electrophoresed on 10% polyacrylamide gel and stained with silver nitrate.

2.4 SOD2_{RS4880} POLYMORPHISM GENOTYPING

A 111 bp fragment containing the SNV region was amplified by PCR, using specific forward (5'-GCCCAGCCTGCGTAGAC-GGTCCC-3') and reverse (5'-TGCCTGGACCCCAGATACCCCAA-3') primers and ultrapure water was used as a negative reaction control. PCR conditions were 0.075 mM of dNTPs, 0.1 uM of each primer, 0.8 mM of MgCl₂, 1X of Buffer, approximately 80 ng of DNA and 1U of Taq polymerase (Invitrogen™), and the PCR temperature cycles for amplification of the

SOD2 fragment were 5 minutes of denaturation at 95°C, 35 cycles of 30 seconds involving denaturation, hybridization and extension at 95°C, 66°C and 72°C respectively and a final extension under the condition of 72°C for 5 minutes.

After amplification, the PCR products underwent a restriction reaction with the enzyme *BsaWI* (New England Biolab, Ipswich, Massachusetts, USA) following the manufacturer's instructions. SNV genotyping was obtained by analyzing the restriction fragments for the C (111 bp) and T (81 and 30 bp) alleles. Therefore, the CC genotype presents only the 111 bp fragment, while the TC has 111 bp, 81 bp and 30 bp fragments and the TT the 81 bp and 30 bp fragments. The PCR amplification and enzyme restriction products were submitted to electrophoresis in 10% polyacrylamide gel (150V for 1h) and stained with aqueous solution of silver nitrate 0.15% (Fig 1).

2.5 STATISTICAL ANALYSIS

The study population was divided into two groups according to the status of HPV infection: uninfected (control) and infected. The infected patients were stratified into without cervical lesion, with low-grade intraepithelial lesion (LSIL) and high-grade intraepithelial lesion (HSIL), according to the result of the cytological examination.

The Kolmogorov-Smirnov test was used to verify the normality of the data for the age variable and the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test to assess the age difference between the groups evaluated.

The deviation from the Hardy-Weinberg balance and the association of socio-epidemiological variables with the groups of infection or with those of injury was assessed by Chi-square test. Logistic regression was used for adjusted prediction of the studied polymorphism influence on infection and injuries development.

The significance level of $P < 0.05$ was adopted. The tests were performed using SPSS Statistics 22.0 software (SPSS Inc., Chicago).

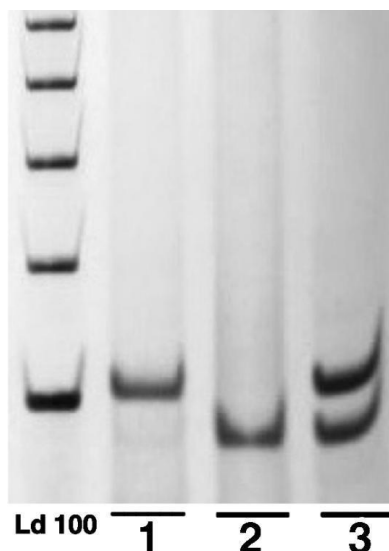


Figure 1 Electrophoretic profile of SOD2 rs4880 polymorphisms: Ld 100: 100 bp molecular standard; 1- CC genotype (111 bp), 2- TT genotype (81 and 30 * bp) and 3- TC genotype (111, 81 and 30 bp). *The 30 bp band cannot be seen in the polyacrylamide gel because, as it is very light, it is lost during the electrophoretic run.

3. RESULTS

The study population consisted of 407 women, of whom 249 (61.1%) tested positive for HPV DNA, and 158 (38.9%) did not. Infected women were divided in groups without lesions (n= 90), Low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) (n= 20), High-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) (n= 67) and cervical cancer (n=72).

3.1 SOCIO-DEMOGRAPHIC, SEXUAL BEHAVIORAL AND REPRODUCTIVE DATA

Sociodemographic, sexual behavior and reproductive data are listed in Table 1 and Table 2, respectively. HPV infection was frequently seen in women aged ≤ 24 years ($p = 0.003$), with incomplete primary education ($p = 0.047$), smokers ($p = 0.005$), married ($p < 0.001$) and was more common among patients who did not know what the virus was ($p = 0.023$). Sexually, patients who had their first sexual intercourse before the age of eighteen ($p = 0.029$) had a higher rate of infection.

Regarding injuries, women over 55 years were more likely to develop cervical cancer ($p < 0.001$), which was more prevalent among widows ($p < 0.011$). In addition, the variables referring to incomplete primary education ($p < 0.001$), smokers ($p < 0.001$), patients who did not know the virus ($p = 0.050$) and also were unaware of its transmission ($p = 0.008$) were significant in the context of injuries, as well as the use of contraceptives ($p = 0.014$) and ≥ 4 pregnancies ($p = 0.005$).

3.2 ANALYSIS OF SNV SOD2 RS4880 IN HPV INFECTION, LSIL, HSIL AND CERVICAL CANCER

According to data in Table 3, it was observed that in the group of non-infected patients, the TC genotype was present in 82 women (51.9%), TT in 47 women (29.8%) and CC in 29 women (18.3%). In the infected group 137 (55.0%) presented the TC genotype, 65 (26.1%) TT genotype, and 47 (18.9%) CC genotype.

There were no significant differences in the distribution of alleles and genotypes in the genetic models presented (genotypic, dominant and recessive) between the group of infected women and the group of uninfected women ($p > 0.05$). Moreover, for LSIL, HSIL and cancer, multinomial logistic regression adjusted for age, educational stage, pregnancies, parturition, marital status, age at first sexual intercourse, sexual partners during the lifetime and contraceptive use was performed. No significant association was observed among the lesions, cervical cancer and the SOD2 rs4880 SNV.

4. DISCUSSION

As far as we know, this is the first study that sought to verify the association of the SOD2 rs4880 polymorphism with HPV infection, the low and high cervical intraepithelial lesions (LSIL and HSIL, respectively) presence and cervical cancer.

This study corroborated with several literatures on various socioepidemiological aspects and sexual behavior. Here, HPV infection was associated with the parameters of age, age at first sexual intercourse, degree of education, knowledge about HPV, smoking and marital status, variables that were also relevant in the appearance of lesions. The variables of knowledge of transmission, 4 or more pregnancies and the use of contraceptives, which were significant only in the injured group.

Regarding to age, younger women had a higher rate of infection, and this association is well established (RAMAKRISHNAN et al., 2015). It is common for adolescents and younger women to be more sexually active, which favors exposure of the epithelium to the virus, an epithelium that already presents itself in lower stages of maturation and exhibits cervical ectopia (HWANG et al., 2012; COSER et al., 2016).

Although lesions are expected to be more frequent in the same younger age group at higher risk for HPV, according to the literature, high-grade lesions were reported to be more prevalent in older women than in younger women, suggesting that lesions regress or are more easily eliminated in younger women (MOSCICKI et al., 2010; NUNES et al., 2014). Similarly, this study demonstrated that older women over

55 are more prone to cancer, which corroborates the data presented by Arbyn et al. (2019), where, despite the global peak of cervical cancer incidence between 50-54 years, the rates continued to increase sharply in the age range of 55-69.

Furthermore, the relationship between lesion persistence and neoplasia development is well described in the literature, where more persistent infections reduce the probability of elimination, so that HPV infections detected in women over 30 years of age persist longer than those in younger women, being more likely to be persistent long-term infections and the evolution to more severe stages of injury and cancer (CROSBIE et al., 2013).

As well as age, smoking is cited as a co-factor for HSIL and cancer development (SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013). In this study, as previously demonstrated by our group (TRUGILO et al., 2019), smokers women presented a higher rate of infection and injury, what can be explained by the fact that smoking can cause immunosuppression, DNA damage and epithelial dysplasia (ALAM et al., 2008; DESRICHARD et al., 2018).

Other data that are in similitude with data published prior by our research group, schooling, knowledge about HPV suggests that the lack of information on HPV and how to avoid exposure probably predisposes women to infection (OKUYAMA et al. 2018; SILVA et al., 2018; TRUGILO et al., 2019).

It is also known that multiparity, which becomes more propitious in women who start sexual life earlier, causes higher risk of exposure of women to HPV infection and other co-factors (LUHN et al., 2013; KRINGS et al., 2019). As well, 4 or more pregnancies were significant because during pregnancy high levels of estrogen and progesterone can lead to exposure of the squamocolumnar junction and metaplasia, leading to immunodepression (REMOUE et al., 2003) and may also have an effect on HPV replication (COELHO et al., 2004).

In addition to socio-epidemiological factors and sexual behavior, other factors may contribute to HPV infection and to the premalignant lesion's development, where the important role of oxidative stress stands out (PRECI et al., 2021). The ROS are involved in the DNA damage leading to the initiation and progression of cervical carcinogenesis, through two possible distinct routes: the first one, where the reactive species act genotoxically and lead to carcinogenesis together with genomic instability arising from HPV infection, as a co-carcinogenesis, or, in the second, where the ROS interact with one or more molecular stages of initiation and/or neoplastic progression

induced by HPV infection (DE MARCO, 2013). Thus, ROS at increased levels have an important role in development of tumors, leading to the accumulation of mutations and inducing genome instability, as well as reprogramming cell metabolism and signaling (KUMARI et al., 2018). Therefore, a better control in the production of ROS in the microenvironment of the lesion could favor the disease resolution (TAN et al., 2018).

The SOD2 with its antioxidant action, reduces enzymatically the anion superoxide accumulation by its conversion into peroxide, a less reactive ROS that will be eliminated by the action of subsequent antioxidants (BIRBEN et al., 2012; BRESCIANI et al., 2015; WANG et al., 2017). Thus, avoiding programmed cell death or the appearance of necrosis, favoring the malignant phenotype (RABELO-SANTOS et al., 2018).

In vitro, Kinnula and Crapo (2004), demonstrated that the increase in the expression of the SOD family members relates with increased cell differentiation, decreased cell growth and proliferation, and reversion of malignant phenotype. Moreover, associated with the reduction of the oxidative stress, the increasing levels of SOD2 managed to prevent DNA injury e consequently cancer development, thus, presenting a protective aspect against malignancy in the cells (CHURCH et al., 1993; LIU et al., 1997; MARTENS et al., 2020).

The function of SOD2 can be influenced by genetic polymorphisms, among them rs4880 of its gene whose effects are not yet fully understood (TAŞ et al., 2019). So far, it has been reported that the CC (Ala/Ala) genotype carries higher enzymatic activity (SUTTON et al., 2005; WANG et al., 2017), but the effect of the genetic variant rs4880 of SOD2 on the susceptibility to some types of cancers seems inconsistent (MARGINEAN et al., 2016; TAŞ et al., 2019; RESZKA et al., 2014; LUI et al., 2018). In breast cancer, for example, it is suggested that the Ala variant is related to an increase in breast cancer of approximately twice and has a lower survival rate than the Val allele (GLYNN et al., 2009; YAO et al., 2010), in addition, the mutation in 1 or 2 alleles of Ala was supposedly associated with increased risks of hepatocellular carcinoma (NAHON et al., 2009) gastric cancer (YI et al., 2010) and prostate cancer (COOPER et al., 2008). In contrast, the TT genotype was related to tumors with greater metastatic potential (BICA et al., 2010).

However, in the present study no associations were found between this SNV and HPV infection, the development of low and high grade squamous intraepithelial lesions and cervical cancer, corroborating a study in Thai women, where the authors

also found no association with this genetic variant (ATTATIPPAHOLKUN, WIKAINAPAKUL, 2013).

Probably, the antioxidant status of individuals may interfere with the effect of this polymorphism on disease susceptibility. Tong et al. (2009) observed that the C allele accompanied by a good antioxidant status seems to be protective against cervical cancer while the increased risk was verified in women with low antioxidant status.

In mitochondria, a higher expression of SOD2 may result in high levels of H₂O₂, which are produced by the dismutated superoxide anion and may induce toxicity if glutathione peroxidase activity or antioxidant levels are low (LI et al., 2005). However, when antioxidant levels are adequate, the increased rate of anion superoxide elimination provided by Ala-SOD2 (C allele) may be beneficial (MIKHAK et al., 2008; TONG et al., 2009).

The present study presents some limitations, as the small number of participants in the low-grade lesions group, what may reduce the statistical power of our analysis. But this case-control study presents also some strengthness, as the collection of socio-epidemiological information from patients, what allowed an adjusted analysis for possible confounding factors.

In short, it was demonstrated that the *SOD2* rs4880 SNV does not contribute to HPV infection, neither to the development of low or high grade cervical intraepithelial lesions and cervical cancer in a Brazilian population.

Table 1. Sociodemographic characteristics of HPV positive patients and controls.

VARIABLES	HPV					p value*	LESIONS								p value*
	HPV +		HPV-		NO LESIONS		LSIL		HSIL		CANCER				
	N	%	N	%	N		%	N	%	N	%	N	%		
Age (years)	≤ 24	34	13.6%	7	4.4%	0.003	24	9.8%	5	25.0%	10	14.9%	2	2.7%	p < 0.001
	25 – 34	65	26.1%	48	30.4%		77	31.4%	6	30.0%	22	32.8%	8	10.7%	
	35 – 44	60	24.1%	39	24.7%		60	24.5%	5	25.0%	16	23.9%	18	24.0%	
	45 – 54	42	16.9%	43	27.2%		51	20.8%	2	10.0%	11	16.5%	21	28.0%	
	≥ 55	48	19.3%	21	13.3%		33	13.5%	2	10.0%	8	11.9%	26	34.6%	
Ethnicity	Caucasian	120	49.8%	82	52.6%	0.590	131	54.1%	7	38.9%	29	46.0%	35	47.3%	0.387
	Not caucasian	121	50.2%	74	47.4%		111	45.9%	11	61.1%	34	54.0%	39	42.7%	
Educational Stage	Incomplete elementary	102	42.3%	44	28.2%	0.047	64	26.3%	5	27.8%	29	46.8%	48	64.9%	p < 0.001
	Complete elementary	29	12.0%	17	10.9%		30	12.4%	1	5.5%	5	8.1%	10	13.5%	
	Incomplete secondary	27	11.2%	20	12.8%		34	14.0%	3	16.7%	7	11.3%	3	4.1%	
	Complete secondary	65	27.0%	55	35.3%		88	36.2%	8	44.4%	16	25.8%	8	10.8%	
	Incomplete higher education	6	2.5%	4	2.5%		7	2.9%	0	0.0%	3	4.8%	0	0.0%	
	Complete higher education	11	4.6%	16	10.3%		20	8.2%	1	5.6%	2	3.2%	4	5.4%	
	None	1	0.4%	0	0.0%		0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	1	1.3%	
Smoking status	No	153	62.7%	118	76.1%	0.005	182	75.8%	12	63.2%	38	58.5%	39	52.0%	p < 0.001
	Yes	91	37.3%	37	23.9%		58	24.2%	7	36.8%	27	41.5%	36	48.0%	
Alcohol consumption	Abstinent	29	82.9%	4	80.0%	0.193	8	88.9%	2	66.7%	12	92.3%	11	73.3%	0.534
	Rarely	1	2.8%	1	20.0%		1	11.1%	0	0.0%	0	0.0%	1	6.7%	
	Occasionally	5	14.3%	0	0.0%		0	0.0%	1	33.3%	1	7.7%	3	20.0%	
	Frequent	0	0.0%	0	0.0%		0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	
	Very frequent	0	0.0%	0	0.0%		0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	
Marital status	Single Married	149	60.0%	119	75.3%	p < 0.001	172	70.2%	12	60.0%	42	62.7%	42	56.8%	0.011
	Civil partner	48	19.4%	11	7.0%		31	12.7%	4	20.0%	15	22.4%	9	12.2%	
	Divorced	30	12.1%	21	13.3%		31	12.7%	3	15.0%	7	10.4%	10	13.5%	
	Widowed	21	8.5%	7	4.4%		11	4.4%	1	5.0%	3	4.5%	13	17.5%	
	≤ 1 minimum wage	4	15.4%	7	22.6%	0.592	10	22.7%	0	0.0%	1	11.1%	0	0.0%	0.676

Monthly family income	>1 - 3 minimum wages	17	65.4%	17	54.8%		26	59.1%	2	100.0%	5	55.6%	1	50.0%	
	>3 - 5 minimum wages	4	15.4%	6	19.4%		7	15.9%	0	0.0%	2	22.2%	1	50.0%	
	>5 - 7 minimum wages	0	0.0%	1	3.2%		1	2.3%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	
	≥ 7 minimum wages	1	3.8%	0	0.0%		0	0.0%	0	0.0%	1	11.1%	0	0.0%	
Knowledge about HPV	No	53	29.4%	27	17.3%	0.023	50	20.6%	4	22.2%	17	29.3%	9	52.9%	0.050
	Have ever heard	79	43.9%	87	55.8%		129	53.1%	8	44.5%	23	39.7%	6	35.3%	
	Yes	48	26.7%	42	26.9%		64	26.3%	6	33.3%	18	31.0%	2	11.8%	
Knowledge about the transmission of HPV	No	83	46.4%	68	43.6%	0.610	102	42.1%	6	33.3%	29	50.0%	14	82.4%	0.008
	Yes	96	53.6%	88	56.4%		140	57.9%	12	66.7%	29	50.0%	3	17.6%	

LSIL (Low-grade squamous intraepithelial lesions); HSIL (High-grade squamous intraepithelial lesions);

*Analysis by two-sided Chi-square (X^2) test and $p < 0.05$ as significance level (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Table 2. Sexual behavioral and reproductive features of HPV positive patients and controls.

VARIABLES	HPV					LESIONS									
	HPV +		HPV-		p value*	NO LESIONS		LSIL		HSIL		CANCER		p value*	
	N	%	N	%		N	%	N	%	N	%	N	%		
Sexual partners during the lifetime	1	43	24.2%	57	36.5%	0.074	82	33.9%	3	16.7%	8	14.0%	7	41.2%	0.106
	2	31	17.4%	27	17.3%		43	17.8%	4	22.2%	8	14.0%	3	17.6%	
	3	30	16.9%	24	15.4%		35	14.5%	4	22.2%	13	22.8%	2	11.8%	
	4	17	9.5%	16	10.3%		26	10.7%	2	11.1%	4	7.0%	1	5.9%	
	≥ 5	57	32.0%	32	20.5%		56	23.1%	5	27.8%	24	42.2%	4	23.5%	
Contraceptive	No	142	57.7%	105	66.9%	0.066	161	66.5%	10	50.0%	41	62.1%	35	46.7%	
	Yes	104	42.3%	52	33.1%		81	33.5%	10	50.0%	25	37.9%	40	53.3%	0.014
Pregnancies	0	30	12.0%	13	8.2%	0.202	30	12.2%	0	0.0%	11	16.4%	2	2.7%	0.005
	1	50	20.1%	27	17.1%		48	19.6%	3	15.0%	15	22.4%	11	14.7%	
	2	58	23.3%	49	31.0%		69	28.2%	5	25.0%	15	22.4%	18	24.0%	
	3	46	18.5%	36	22.8%		53	21.6%	5	25.0%	12	17.9%	12	16.0%	
	≥ 4	65	26.1%	33	20.9%		45	18.4%	7	35.0%	14	20.9%	32	42.6%	
Parturition	Natural birth	71	45.8%	64	44.8%	0.298	90	42.5%	10	55.6%	27	52.9%	8	47.1%	0.003
	Cesarean birth	42	27.1%	49	34.2%		75	35.3%	2	11.1%	13	25.5%	1	5.8%	
	Both	42	27.1%	30	21.0%		47	22.2%	6	33.3%	11	21.6%	8	47.1%	
Age at menarche (years)	≤11	45	24.2%	35	22.2%	0.559	55	22.5%	4	20.0%	16	26.2%	5	27.8%	0.321
	12	51	27.4%	35	22.2%		59	24.1%	4	20.0%	16	26.2%	7	38.8%	
	13	40	21.5%	41	25.9%		54	22.0%	9	45.0%	15	24.6%	3	16.7%	
	≥14	50	26.9%	47	29.7%		77	31.0%	3	15.0%	14	23.0%	3	16.7%	
Age at first sexual intercourse (years)	≤17	148	61.4%	79	50.3%	0.029	129	52.9%	14	73.7%	41	63.1%	43	61.4%	0.145
	≥18	93	38.6%	78	49.7%		115	47.1%	5	26.3%	24	36.9%	27	38.6%	

LSIL (Low-grade squamous intraepithelial lesions); HSIL (High-grade squamous intraepithelial lesions);

*Analysis by two-sided Chi-square (X^2) test and $p < 0.05$ as significance level (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Table 3. Association between the SNV rs4880 from SOD2, HPV infection and Squamous Intraepithelial Lesions.

		HPV		<i>p</i> value*	LESIONS				<i>p</i> value*
		HPV +	HPV -		NORMAL	LSIL	HSIL	CÂNCER	
		N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	N (%)	N(%)	
Codominant	TT	65 (26.1%)	47 (29.8%)	0.721	72 (29.4%)	3 (15.0%)	22 (32.9%)	15 (20.0%)	0.404
	CT	137 (55.0%)	82 (51.9%)		128 (52.3%)	12 (60.0%)	36 (53.7%)	43 (57.3%)	
	CC	47 (18.9%)	29 (18.3%)		45 (18.3%)	5 (25.0%)	9 (13.4%)	17 (22.7%)	
Dominant model	TT	65 (26.1%)	47 (29.7%)	0.429	72 (29.4%)	3 (15.0%)	22 (32.9%)	15 (20.0%)	0.166
	CT+CC	184 (73.9%)	111 (70.3%)		173 (70.6%)	17 (85.0%)	45 (67.1%)	60 (80.0%)	
Recessive model	CC	47 (18.9%)	29 (18.3%)	0.895	45 (18.3%)	5 (25.0%)	9 (13.4%)	17 (22.7%)	0.468
	CT+TT	202 (81.1%)	129 (81.7%)		200 (81.7%)	15 (75.0%)	58 (86.6%)	58 (77.3%)	
Alleles	T	267 (53.6%)	176 (55.6%)	0.561	272 (55.5%)	18 (60.0%)	80 (59.7%)	73 (48.6%)	0.159
	C	231 (46.4%)	140 (44.4%)		218 (44.5%)	22 (40.0%)	54 (40.3%)	77 (51.4%)	

*Analysis by two-sided Chi-square (X^2) test and $p < 0.05$ as significance level (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Table 4. Association between the SNV rs4880 from SOD2 and Squamous Intraepithelial Lesions and cervical cancer by multinomial logistic regression.

MODELS		LSIL		HSIL		CANCER	
		OR (CI 95%)	<i>p</i> value*	OR (CI 95%)	<i>p</i> value*	OR (CI 95%)	<i>p</i> value*
Codominant	CC	1		1		1	
	TC	0.46 (0.12-1.78)	0.267	1.30 (0.62-2.69)	0.482	0.61 (0.40-4.63)	0.614
	TT	0.82 (0.20-3.29)	0.785	0.80 (0.30-2.13)	0.658	0.59 (0.10-3.46)	0.559
Dominant	II	1		1		1	
	TC+CC	1.76 (0.34-9.03)	0.496	0.55 (0.23-1.27)	0.162	0.53 (0.12-2.24)	0.388
Recessive	CC	1		1		1	
	TC+TT	1.08 (0.27-4.21)	0.908	1.37 (0.54-3.50)	0.500	1.94 (0.38-9.89)	0.422

*LSIL (Low-grade squamous intraepithelial lesions); HSIL (High-grade squamous intraepithelial lesions); OR (odds ratio) and CI (confidence interval) 95% estimated by multinomial logistic regression; $p < 0.05$, adjusted by (age, educational stage, pregnancies, parturition, marital status, age at first sexual intercourse, sexual partners during the lifetime and contraceptive) (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)

REFERENCES OF THE ARTICLE

ABRAMOWITZ, L. et al. Human papillomavirus genotype distribution in anal cancer in France: the EDiTH V study. **International Journal of Cancer**, v.129, n.2, p.433–439, sep. 2011.

ATTATIPPAHOLKUN, W.; WIKAINAPAKUL, K. Predominant genotypes and alleles of two functional polymorphisms in the manganese superoxide dismutase gene are not associated with Thai cervical or breast cancer. **Asian Pacific journal of cancer prevention**, v.14, n.6, p.3955-61, jun. 2013.

ALAM, S. et al: The cigarette smoke carcinogen benzo[a]pyrene enhances human papillomavirus synthesis. **J Virol**. v.82, n.2, p.1053–1058, nov. 2008.

ARBYN, M. et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. **The Lancet Global Health**, v.8, n.2, p.e191–e203, dec. 2019.

BAUER, H.M. et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. **JAMA**, v.265, p.472–477, 1991.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, p.629-643, 2010.

BICA, C. G. et al., Polymorphism (ALA16VAL) correlates with regional lymphnode status in breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.196, p.153-158, sep. 2010.

BIRBEN, E.et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**. v.5, p.9–19, jan. 2012.

BRASIL. **Estimativa 2020: Incidência do Câncer no Brasil**. INCA, 2020.

BRESCIANI, G.; DA CRUZ, I. B.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. **Advances in clinical chemistry**, v.68, p.87-130, jan. 2015.

BURD, E. M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Clin Microbiol Rev.**, v.16, n.1, p.1-17, jan. 2003.

CALAF, G. M.; URZUA, U.; TERMINI, L.; AGUAYO, F. Oxidative stress in female cancers. **Oncotarget**, v.9, n.34, p.23824-23842, may. 2018.

CHURCH, S. L. et al. Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, n.7, p. 3113–3117, apr. 1993.

COELHO, F. R. G. Estrogen and progesterone receptors in human papilloma virus-related cervical neoplasia. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.37, n.1, p.83-88, jan. 2004.

COOPER, M. L. et al. Interaction between SNPs in selenoprotein P and mitochondrial superoxide dismutase determines prostate cancer risk. **Cancer Res.** n.68, v.24, p.10171–10177. dec. 2008.

COSER J. et al: Cervical human papillomavirus infection and persistence: a clinic-based study in the countryside from South Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.20, p.61–68, 2016.

CROSBIE, E. J. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, v.382, n.9895, p.889–899, apr. 2013.

DESIRICHARD, A. et al. Tobacco Smoking-Associated Alterations in the Immune Microenvironment of Squamous Cell Carcinomas. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v.110, n.12, dec. 2018.

DE MARCO, F. Oxidative stress and HPV carcinogenesis. **Viruses**, v.5, n.2, p.708-31, feb. 2013.

DUNNE, E. F.; PARK, I. U. **HPV and HPV-Associated Diseases.** *Infect. Dis. Clin. N. Am.* n.27, p.765–778. 2013.

EGAWA, N.; DOOBAR, J. The low-risk papillomaviruses. **Virus Research.** v.231, n.2 p.119-127, mar. 2017.

FERREIRA, M. et al. HPV DNA detection and genotyping in 21 cases of primary invasive squamous cell carcinoma of the vagina. **Modern Pathology**, v.21, n.8, p.968–972, may. 2008.

GLYNN, S. A. et al. A Mitochondrial Target Sequence Polymorphism in MnSOD Predicts Inferior Survival in Breast Cancer Patients Treated with Cyclophosphamide. **Clin Cancer Res.** v.15, n.12, p.4165–4173. jun. 2009.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society transactions**, v.35, p.1147-50, nov. 2007.

HWANG, L. Y. et al. Cervical ectopy and the acquisition of human papillomavirus in adolescents and young women. **Obstetrics and Gynecology**, v.119, n.6, p.1164 – 1170, jun. 2012.

JABIR, F. A.; HOIDY, W. H. Pharmacogenetics as Personalized Medicine: Association Investigation of SOD2 rs4880, CYP2C19 rs4244285, and FCGR2A rs1801274 Polymorphisms in a Breast Cancer Population in Iraqi Women. **Clinical breast cancer**, v.18, n.5, p.e863-e868, oct. 2018.

KINNULA, V. L.; CRAPO, J. D. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. **Free Radical Biology and Medicine**, v.36, n.6, p.718–744, 2004.

KRINGS, A. et al. Characterization of Human Papillomavirus prevalence and risk factors to guide cervical cancer screening in the North Tongu District Ghana. **PLoS One**, v.16, p.1–19, jun 2019.

KUMARI, S. et al. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. **Biomarker Insights**, v.13, p.1-9. feb. 2018.

LI, H. et al. Manganese superoxide dismutase polymorphism, prediagnostic antioxidant status, and risk of clinical significant prostate cancer. **Cancer research**, v.65, n.6, p.2498-504, mar. 2005.

LI, N.; HUANG, H. Q.; ZHANG, G. S. Association between SOD2 C47T polymorphism and lung cancer susceptibility: a meta-analysis. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v.35, n.2, p. 955-9, feb. 2014.

LIU, R.; OBERLEY, T. D.; OBERLEY, L. W. Transfection and Expression of MnSOD Tumor Malignancy of Human Oral Squamous Carcinoma SCC-25. **Human Gene Therapy**. v.8, p.585–595, 1997.

LUHN, P. et al. The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer. **Gynecol. Oncol.** v.128, n.2, p.265–270, feb. 2013.

LUI, G. et al. Association between genetic polymorphisms and platinum-induced ototoxicity in children. **Oncotarget**, v.9, n.56, p.30883-30893, jun. 2018.

MARANGON, A. V. et al. The Association of the immune response genes to human papillomavirus-related cervical disease in a Brazilian Population. **BioMed Research International**, v.2013, p.1–11, 2013.

MARGINEAN, C. et al. Assessment of Oxidative Stress Genes SOD2 and SOD3 Polymorphisms Role in Human Colorectal Cancer. **Current Health Sciences Journal**, v.42, n.4, oct-dec. 2016.

MARTENS, A. et al., Telomerase Does Not Improve DNA Repair in Mitochondria upon Stress but Increases MnSOD Protein under Serum-Free Conditions. **Int J Mol Sci.** v.21, n.1, p.1-27, jan. 2020.

MIKHAK, B. et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism, interactions with carotenoid levels and prostate cancer risk. **Carcinogenesis**, v.29, n.12, p.2335-40, dec. 2008.

MOSCICKI, A-B. et al. Rate of and Risks for Regression of CIN-2 in adolescents and young women. **Obstet. Gynecol.** v.116, n.6, p.1373–1380, dec. 2010.

NAHON, P. Myeloperoxidase and Superoxide Dismutase 2 Polymorphisms Comodulate the Risk of Hepatocellular Carcinoma and Death in Alcoholic Cirrhosis. **Hepatology**, v.50, n.5, jul. 2009.

NIKIC, P. et al. Association between GPX1 and SOD2 genetic polymorphisms and overall survival in patients with metastatic urothelial bladder cancer: a single-center study in Serbia. **JBUON**. v.23, n.4, p.1130-1135. 2018.

NUNES, J. D. C. et al., Molecular detection of human papillomavirus in Brazilian women with cervical intraepithelial neoplasia in a northeast Brazilian city. **Genetics and Molecular Research**, v.13, n.4, p.9077-9085, oct. 2014.

OKUYAMA, N. C. M. et al., Genetic variant in CXCL12 gene raises susceptibility to HPV infection and squamous intraepithelial lesions development: a case-control study. **Journal of Biomedical Science**, n.69, v.25, p. 1–10, sep. 2018.

PRECI, D. P. et al. Oxidative damage and antioxidants in cervical cancer. **Int. J. Gynecol. Cancer**. v.31, n.2, p.265-271, feb. 2021.

RABELO-SANTOS, S. H. et al. Strong SOD2 expression and HPV-16/18 positivity are independent events in cervical cancer. **Oncotarget**, v.9, n.31, p.21630-21640, mar. 2018.

RAMAKRISHNAN, S.; PARTRICIA, S.; MATHAN, G. Overview of high-risk HPV's 16 and 18 infected cervical cancer: Pathogenesis to prevention. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.70, p.103–110, dec. 2015.

REMOUE, F. et al. High intraepithelial expression of estrogen and progesterone receptors in the transformation zone of the uterine cervix. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.189, n.6, pp.1660-1665. 2003.

RESZKA, E. et al. Polymorphisms of NRF2 and NRF2 target genes in urinary bladder cancer patients. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.140, p.1723–1731, jun. 2014.

ROSA, M. I. et al. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. *Cad. Saúde Pública*, v.25, n.5, p.953-964, may, 2009.

RUBIN, M. A. et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: Evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. **American Journal of Pathology**, v.159, n.4, p.1211–1218, oct. 2001.

SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v.22, n.4, p.553–560, 2013.

SILVA, R. C. G. et al., Profile of women with cervical cancer attended for treatment in oncology center. **Rev. Bras. Saúde Mater. Infant.**, v.18, n.4, p.695-702, oct-dec., 2018.

STOEHLMACHER, J. et al. The 9Ala/-9Val polymorphism in the mitochondrial targeting sequence of the manganese superoxide dismutase gene (MnSOD) is associated with age among Hispanics with colorectal carcinoma. **Oncology reports**, v.9, n.2, p.235-8, mar. 2002.

SUTTON, A. et al. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. **Pharmacogenetics and Genomics**, v.15, n.5, p.311-319, may. 2005.

SYRJÄNEN, S.; RAUTAVA, J.; SYRJÄNEN, K. HPV in head and neck cancer—30 years of history. **Recent Results in Cancer Research**, v.206, p.3–25, oct. 2017.

TAN, B. L. Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. **Front. Pharmacol.**, v.9, n.1162, p.1-28, oct. 2018.

TAŞ, A. et al. Role of SOD2 Ala16Val polymorphism in primary brain tumors. **Biomedical reports**, v.10, n.3, p.189-194, mar. 2019.

TONG, S. Y. et al. Functional polymorphism in manganese superoxide dismutase and antioxidant status: their interactions on the risk of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. **Gynecologic oncology**, v.115, n.2, p.272-276, nov. 2009.

TRUGILO K. P. et al. Polymorphisms in the TGF β 1 signal peptide influence human papillomavirus infection and development of cervical lesions. **Medical microbiology and immunology**, v.208, n.1, p.49-58, feb. 2019.

VAN DER AVOORT, I. A. M. Vulvar Squamous Cell Carcinoma is a Multifactorial Disease Following Two Separate and Independent Pathways. **Int. J. Gynecol. Pathol**, v.25, n.1, p.22-29. jan. 2006.

WANG, W. et al. SOD2 Facilitates the Antiviral Innate Immune Response by Scavenging Reactive Oxygen Species. **Viral immunology**, v.00, n.00, p.1-8. 2017.

YAO, S. et al. Manganese superoxide dismutase polymorphism, treatment-related toxicity and disease-free survival in SWOG 8897 clinical trial for breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**. v.124, n.2, p.433–439. nov. 2010.

YI, J. P. et al. Mn-SOD and CuZn-SOD polymorphisms and interaction with risk factors in gastric cancer. **World J. Gastroenterol**. v.16, n.37, p. 4738-4746, oct. 2010.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and ec-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v.33, n.3, p.337–349, may. 2002.

5. CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Concluiu-se com esse estudo caso-controle:

- A presença do vírus HPV foi investigada em 407 mulheres atendidas pelo SUS na região Norte do Paraná, destas 158 (38,9%) mulheres foram negativas e 249 (61,1%) HPV positivas.
- A frequência genotípica do polimorfismo rs4880 de *SOD2* em mulheres infectadas por HPV foi de 26,1% mulheres TT, 55,0% de mulheres TC e 18,9% CC. No grupo controle, 51,9% das mulheres apresentaram o genótipo TC, 29,8% TT e 18,3% CC.
- O alelo T, selvagem, foi identificado na frequência de 55,5% das mulheres sem lesão, 60,0% das mulheres com LIEBG, 59,7% com LIEAG e em 48,6% no grupo câncer. Também, o alelo C, mutado, distribuiu-se nas mulheres HPV positivas na frequência de 44,5% no grupo que não apresenta lesão, 40,0% com lesão de baixo grau (LIEBG), 40,3% com lesão de alto grau (LIEAG) e de 51,3% nas pacientes portadoras de câncer.
- Idade até 24 anos, primeira relação sexual antes dos 18 anos, ensino fundamental incompleto, tabagistas, casadas, uso de anticoncepcional e desconhecimento sobre o HPV foram variáveis associadas com a infecção pelo HPV.
- Mulheres com 55 anos e com 4 ou mais gestações são mais suscetíveis ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais.
- Não houve associação entre polimorfismo rs4880 de *SOD2* com a infecção pelo HPV, nem com o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e do câncer de colo de útero.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de não encontrarmos associação entre o polimorfismo *rs4880* de *SOD₂* (GTT→GCT) com o desenvolvimento de lesões de alto e baixo grau e o câncer, nosso estudo caso-controle conta com um rico levantamento de dados socioepidemiológicos e de hábitos, muitas das variáveis associadas corroboram com dados encontrados na literatura e por nosso grupo de pesquisa. Este é o primeiro estudo que avaliou a associação genotípica entre o SNV *rs4880* de *SOD₂*, e as neoplasias cervicais, seria interessante a análise de uma maior população de estudo, além de outros marcadores para as espécies reativas de oxigênio (EROs) afim de elucidar o papel destas moléculas na progressão das lesões cervicais e no desenvolvimento do carcinoma cervical.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

“Prevalência e genotipagem de HPV e sua possível associação com os genes de citocinas, quimiocinas e seus receptores em nível de DNA, RNA e proteína: implicações no microambiente tumoral.”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa **“Prevalência e genotipagem de HPV e sua possível associação com os genes de citocinas, quimiocinas e seus receptores em nível de DNA, RNA e proteína: implicações no microambiente tumoral.”**, realizada no **“Laboratório de Genética Molecular e Imunologia, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina”**. O objetivo da pesquisa é avaliar a presença do vírus em mulheres atendidas em programas de prevenção ao câncer cervical do setor público de saúde da região norte do Paraná, por meio de metodologia específica e sensível, visando também à associação de dados demográficos, para análise dos fatores de risco que contribuem para a exposição da população ao vírus, bem como os determinantes de sua manutenção. Adicionalmente objetiva-se compreender o papel do sistema imune no controle e iniciação tumoral, bem como na sua formação, crescimento e progressão, em especial avaliar a interação tumor-hospedeiro em pacientes portadoras do vírus HPV e no desenvolvimento do câncer cervical. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: **doação de 5mL de sangue periférico coletado por punção venosa e doação do swab cervico-vaginal utilizado para confecção das lâminas para o exame preventivo para análises moleculares, bem como responder um questionário sociodemográfico**. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

As amostras biológicas (sangue periférico e secreção cervico-vaginal) serão utilizados para extração de DNA e RNA para análises moleculares e imunológicas. Estes materiais serão obtidos em pequenas quantidades portanto não haverá sobra de material biológico.

Os benefícios esperados são a detecção precoce do vírus HPV em mulheres atendidas em programas de prevenção ao câncer de colo de útero do setor público de saúde da região norte do Paraná. Informamos que a paciente que se dispôr a participar do projeto não sofrerá desconfortos nem riscos à saúde, não havendo qualquer prejuízo às mesmas. Informamos que a senhora não pagará nem será remunerada por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar **Karen Brajão de Oliveira, Laboratório de Genética Molecular e Imunologia, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, 3371-4267, karen.brajao@uel.br**, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 33712490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ____ de ____ de 201__

Pesquisador Responsável _____
 Profª. Drª. Karen Brajão de Oliveira
 RG: 6.538.742-5

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

APÊNDICE B

Questionário Socioepidemiológico

Nº LAB

ANEXO 1 - QUESTIONÁRIO SOCIOEPIDEMIOLÓGICO

Data: ___/___/___

Reg. N° _____

1. Telefone: _____

Email: _____

2. Conhece o HPV???

 Nunca ouvi falar
 Já ouvi falar mas não sei o que é
 Conheço

3. Conhece as formas de transmissão ou formas de contrair o vírus?

 Não **Sim** Qual ou quais:

4. Idade _____ anos DN, _____

5. Etnia: _____

Branca / parda / negra / asiática / indígena

6. Sua renda mensal (em salário mínimo) é de?

 Até 1 Salário **De 1 à 3 salários**
 De 3 à 5 salários **De 5 à 7 salários**
 De 7 à 10 salários

7. Você fuma?

 Não
 Sim Tempo: _____
 Ex-fumante tempo que fumou _____
Quando parou _____

8. Qual o seu grau de escolaridade?

 Fundamental Incompleto
 Fundamental Completo
 Médio Incompleto **Médio completo**
 Superior incompleto **Sup. completo**

9. Estado Civil:

 Solteira **Casada / união estável**
 Divorciada/separada **Viúva**

10. Qual sua profissão? _____

 11. Faz o uso de anticoncepcional? **N** **S**

Qual _____

 12. Faz uso de preservativo? **N** **S**

13. Nº Gestações: _____

14. Números de Partos Normais: _____

15. Numero de cesárea: _____

16. Abortos: _____

17. Idade da 1ª relação sexual: _____ anos

18. Idade da 1ª menstruação: _____ anos

19. Número de parceiros sexuais:

durante a vida: _____

nos últimos 6 meses: _____.

20. Já realizou outros exames preventivos?

 Sim **Não**

21. Com qual frequência realiza os preventivos?

Último exame: _____

22. Existem casos de câncer de colo de útero em sua família?

 Sim **Não**

Em caso de resposta ``SIM`` descrever o grau de parentesco: _____

23. PESO _____

24. Altura _____

25. IMC: _____

26. Circunferência abdominal: _____

27. Faz algum tipo de tratamento para outra doença?

Qual?

28. Está na menopausa? _____

29. Faz reposição hormonal? _____

Medicação: _____

28. Faz uso de bebida alcoólica? _____

Com qual frequência? _____

Pesquisador: _____

ANEXOS

ANEXO A

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

 UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA			
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS Universidade Estadual de Londrina Registro CONEP 5231			
Parecer CEP/UEL:	133/2012		
CAAE:	05505912.0.0000.5231		
Processo:	19275/2012		
Pesquisador(a):	Karen Brajão de Oliveira		
Unidade/Órgão:	CCB – Departamento de Ciências Patológicas		
Prezado(a) Senhor(a): O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto: "PREVALÊNCIA E GENOTIPAGEM DE HPV E SUA POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM OS GENES DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES EM NÍVEL DE DNA, RNA E PROTEÍNA: implicações no microambiente tumoral."			
Situação do Projeto: Aprovado Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá ser encaminhado ao CEP/UEL relatório final da pesquisa, conforme prevê a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares.			
Londrina, 28 de agosto de 2012.			
 Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos Universidade Estadual de Londrina			
Prof. Dr. Paulo Mariza Zedler Alliprandini Vice-Coord. do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos Universidade Estadual de Londrina			
<small> Rua 12 de Outubro, 3150 - Jardim Cristo Rei - CEP 54600-000 - Londrina - PR - Fone: (51) 3370-8000 - FAX: (51) 3370-4446 - Caixa Postal 6081 - CEP 54601-600 - E-mail: cep@uel.br </small>			