

Determinação dos genótipos do GSTM1 e a sua relação com o desenvolvimento de lesões na cérvix uterina causadas por HPV

Lara Salomé Seabra da Silva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof.^a Doutora Ana Cristina Ramalhinho Tavares Patricio
Coorientador: Prof.^a Doutora Luiza Augusta Tereza Gil Beitenfeld Granadeiro
Coorientador: Mestre Micaela Carina Pereira Almeida

junho de 2023

Declaração de Integridade

Eu, Lara Salomé Seabra da Silva, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M11839 de Bioquímica da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 12 /06 /2023

Dedicatória

Aprendi que somos capazes de fazer muito mais do que imaginamos. Dedico esta tese a todas as pessoas presentes na minha vida e a todos aqueles que não desistem dos seus objetivos.

“Mesmo desacreditado e ignorado por todos, não posso desistir, pois para mim, vencer é
nunca desistir.”

Albert Einstein

Agradecimentos

Por vezes pensamos que não somos bons o suficiente para alcançar certos objetivos na nossa vida. Deixamos de voar mais alto porque achamos que não somos capazes. A realização desta dissertação fez-me perceber que com dedicação e trabalho tudo é possível. Foi um percurso académico marcado por momentos inesquecíveis, muitas emoções e aprendizagens. Assim e chegando ao fim deste desafio não podia deixar de agradecer a todos os que prestavelmente contribuíram para o meu crescimento tanto a nível pessoal como profissional.

Agradeço à Professora Doutora Ana Cristina Ramalhinho por ter aceite ser a minha orientadora e por me ter aberto as portas a esta trabalhosa caminhada. Obrigada por todo o apoio, orientação, encorajamento, profissionalismo, simpatia e confiança proporcionados ao longo deste projeto.

À Mestre Micaela Almeida, pela sua disponibilidade, paciência, preocupação e simpatia. Obrigada pelas dúvidas esclarecidas, as mensagens trocadas, sugestões de trabalho e escrita e sobretudo pela sua presença ao longo desta caminhada.

À Professora Doutora Luiza Granadeiro por me receber com um sorriso no rosto, dando-me o incentivo de que a concretização desta etapa profissional estava ao meu alcance.

Um enorme obrigada à Cíntia, pela excelente relação de trabalho de equipa e parceria no laboratório. Obrigada pelas mensagens e chamadas, desabafos, choros, gargalhadas, conselhos, incentivo e por nunca me deixares desistir e acreditar que eu seria capaz de chegar ao fim deste percurso. Mereces muito sucesso na tua vida e sobretudo muita felicidade!

A todos os meus amigos, amigas e colegas de curso. Foram 6 anos de momentos emocionantes que serão sempre recordados. Um bem-haja pela vossa amizade. Um especial obrigada ao Casanova e à Duda, a minha segunda família e os meus companheiros de casa. Obrigada pelas inúmeras gargalhadas, pelos almoços e jantares juntos e sobretudo por todo o apoio nos momentos menos bons.

À minha família, em especial aos meus pais por todo o apoio, carinho e amor demonstrados ao longo da minha vida e por todas as palavras de incentivo e força dadas

durante o meu percurso académico. Obrigada por todos os ensinamentos que fizeram com que me tornasse a pessoa que sou hoje.

A ti Covilhã, cidade neve. Levo-te comigo para a vida.

Resumo

O Vírus do Papiloma Humano (HPV) é uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comum em todo o mundo. Ambos os sexos estão envolvidos na cadeia epidemiológica, podendo ser portadores assintomáticos, transmissores e vítimas deste vírus. O vírus pode não ser eliminado pelo sistema imunológico, proporcionando o desenvolvimento de certos cancros, como o cancro do colo do útero. Mais de 200 genótipos de HPV já foram sequenciados e caracterizados, encontrando-se divididos em dois grupos: HPV de alto risco ou oncogénicos e HPV de baixo risco ou não oncogénicos. Nas estirpes de HPV de alto risco destacam-se os tipos 16 e 18 sendo os mais cancerígenos e com maior associação ao desenvolvimento de cancro do colo do útero.

As S-transferases da glutathione (GSTs) são uma superfamília de enzimas envolvidas na manutenção da integridade celular, stress oxidativo e proteção contra danos no ADN, reduzindo compostos através da conjugação com a glutathione (GSH) nas reações metabólicas de fase II. A glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1), pertencente a esta família, é capaz de codificar uma enzima de fase II, responsável por destoxificar alguns xenobióticos. Os polimorfismos do gene GSTM1 têm vindo a ser estudados devido ao seu envolvimento em processos patológicos, como é o caso do cancro do colo do útero. O polimorfismo nulo do GSTM1 tem como consequência a não codificação da enzima GSTM1, o que compromete a destoxificação da célula, uma vez que reduz a metabolização de substâncias tóxicas, favorecendo a carcinogénese. Assim, avaliar a possível relação entre a deleção do GSTM1 e a infeção por HPV em lesões do colo do útero poderá ser um elemento-chave para investigações futuras.

O objetivo principal deste trabalho, consistiu na determinação dos genótipos do GSTM1 e das estirpes de HPV, em 37 mulheres com lesões no colo do útero, de modo a avaliar uma possível relação entre a infeção por HPV e o genótipo do GSTM1. A identificação do genótipo e das estirpes de HPV foi realizada a partir de tecido de lâminas de tecido parafinado. A identificação dos genótipos do GSTM1 foi realizada por PCR em tempo real, e as estirpes de HPV foram identificadas através do sistema *Anyplex™ II HPV HR Detection (Anyplex HR; Seegene, Seoul, Korea)*.

Os resultados foram analisados estatisticamente, tendo-se verificado que parece não haver associação entre a deleção do GSTM1 e o desenvolvimento de lesões da cérvix uterina causadas por HPV.

Palavras-chave

Cancro do colo do útero; GSTM1; HPV; Polimorfismo.

Abstract

The Human Papilloma Virus (HPV) is one of the most common sexually transmitted diseases worldwide. Both sexes are involved in the epidemiological chain and may be asymptomatic carriers, transmitters, or victims of this virus. The immune system presents a crucial role in the elimination of this virus. However, if not eliminated, it may lead to the development of certain cancers, such as cervical cancer. More than 200 HPV genotypes have been sequenced and characterized being divided into 2 groups: high-risk or oncogenic HPV and low-risk or non-oncogenic HPV. High-risk HPV strains include types 16 and 18, which are the most carcinogenic and most associated with the development of cervical cancer.

Glutathione S-transferases (GSTs) are a superfamily of enzymes that regulate cell integrity, oxidative stress, and protection against DNA damage by reducing compounds through conjugation with glutathione (GSH) in phase II metabolic reactions. Glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1), belonging to this family, can encode a phase II enzyme responsible for detoxifying some xenobiotics. The gene GSTM1 polymorphism's interest arises owing to their involvement in the pathological processes of cervical cancer. The null polymorphism of GSTM1 results in the non-coding of the GSTM1 enzyme, which compromises cell detoxification since it reduces the metabolism of toxic substances, favouring carcinogenesis. Thus, assessing the possible relationship between GSTM1 deletion and HPV infection in cervical lesions may be a key element for future research.

The study focuses were to determine the GSTM1 genotypes and HPV strains in 37 women with cervical lesions in order to evaluate a possible relationship between HPV infection and the GSTM1 genotype. Genotype and HPV strain identification was performed from paraffin-embedded tissue slides. GSTM1 genotype identification was performed by real-time PCR, and HPV strains were identified using the Anyplex™ II HPV HR Detection System (*Anyplex HR; Seegene, Seoul, Korea*).

The results obtained showed that there seems to be no association between GSTM1 deletion, and the development of uterine cervix lesions caused by HPV.

Keywords

Cervical cancer; GSTM1; HPV; Polymorphism.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Vírus do Papiloma Humano	1
1.1.1 Estirpes de alto e baixo risco	2
1.1.2 Transmissão do HPV	2
1.2 Incidência mundial da infecção por HPV	2
1.2.1 HPV de alto risco.....	4
1.3 HPV de alto risco e o desenvolvimento de cancro	4
1.4 Diagnóstico de HPV e deteção de cancro do colo do útero	6
1.4.1 Citologia convencional.....	7
1.4.2 Citologia de base líquida.....	7
1.4.3 Teste de HPV	7
1.4.4 Colposcopia	8
1.5 S-Transferases da Glutationa	8
1.5.1 Mecanismo de ação das GSTs	9
1.5.2 GSTM1	10
1.6 GSTs e o desenvolvimento de cancro do colo do útero promovido pelo HPV	11
2. Objetivos.....	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. Materiais e métodos	14
3.1 População em estudo	14
3.2 Procedimentos laboratoriais	14
3.2.1 Extração de ADN de tecido montado em lâminas parafinado	14
3.2.2 Identificação da estirpe de HPV.....	17
3.2.3 Identificação do genótipo do GSTM1 por PCR em tempo real	18
3.2.4 Análise estatística.....	18
4. Análise de resultados.....	19
5. Discussão dos resultados	23
6. Conclusão e perspetivas futuras	25
7. Referências Bibliográficas	26

Lista de Figuras

Figura 1 - Prevalência do Vírus do Papiloma Humano (HPV) em mulheres com achados citológicos normais.....	3
Figura 2 - Modelo conceitual da infecção pelo vírus do HPV que conduz ao cancro do colo do útero.....	5
Figura 3 - Fração de cancros associados ao Vírus do Papiloma Humano (HPV) por região geográfica e sexo.....	6
Figura 4 - Esquema de extração de ADN de tecido montado em lâminas parafinado de acordo com o kit <i>QIAamp® DNA FFPE Tissue</i>	16
Figura 5 - Esquema do método para identificação das estirpes de HPV de acordo com o sistema <i>Anyplex™ II HPV HR Detection</i>	17
Figura 6 - Curva de <i>melting</i> da amostra 16, que possui genótipo presente	19
Figura 7 - Curva de <i>melting</i> da amostra 29, que possui genótipo nulo	19

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características das 45 mulheres com lesões na cérvix uterina avaliadas no estudo.....	17
Tabela 2 - Primers utilizados para a amplificação da região polimórfica do GSTM1	18
Tabela 3 - Relação entre os genótipos do GSTM1 e a idade.....	20
Tabela 4 – Relação entre a prevalência de HPV e a idade.....	20
Tabela 5 – Relação entre a prevalência de HPV e os genótipos GSTM1.....	21
Tabela 6 – Relação entre a presença de uma estirpe de HPV e os genótipos GSTM1.....	21
Tabela 7 – Relação entre a presença da estirpe de HPV 16 e os genótipos GSTM1.....	22
Tabela 8 – Relação entre a presença de duas estirpes diferentes de HPV e os genótipos GSTM1.....	22

Lista de Acrónimos

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
CBL	Citologia em Base Líquida
CHUCB	Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira
DSTs	Doenças Sexualmente Transmissíveis
GSH	Glutationa
GSTs	S-Transferases da Glutationa
GSTM1	Glutationa S-Transferase mu 1
GSTT1	Glutationa S-Transferase teta 1
HPV	Vírus do Papiloma Humano
MAPEG	Proteínas associadas à Membrana envolvidas no Metabolismo de Eicosanóides e Glutationa
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
UBI	Universidade da Beira Interior

1. Introdução

1.1. Vírus do Papiloma Humano

O Vírus do Papiloma Humano (HPV) é um vírus pertencente à família *Papillomaviridae*, responsável por infectar vertebrados, incluindo humanos. É um vírus de ADN, com genoma circular e de fita dupla, não encapsulado e de pequenas dimensões (cerca de 8000 pares de bases) que coabitou com a espécie humana durante milhares de anos e que sofreu relativamente poucas alterações na sua composição genética [1].

O HPV é considerado uma das doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) mais comum em todo o mundo [2]. É responsável por infectar homens e mulheres, embora a infeção seja mais significativa nas mulheres, devido à alta suscetibilidade das células cervicais para com o vírus [1]. Ambos os sexos estão envolvidos na cadeia epidemiológica da infeção e são capazes de, ao mesmo tempo, serem portadores assintomáticos, transmissores e vítimas da mesma. De um modo geral, a infeção é de regressão espontânea, clinicamente assintomática e controlada pela imunidade do indivíduo, que pode nunca saber que esteve infetado [2].

Cada tipo de HPV está adaptado evolutivamente a um determinado tecido epitelial humano [3]. Alguns tipos de HPV têm a capacidade de se instalar nos diferentes epitélios escamosos ou mucosas, tendo uma afinidade específica pela pele genital e mucosa. A infeção duradoura por HPV, não é eliminada pelo sistema imunológico sendo caracterizada por ADN de HPV persistentemente detetável. A falha ao eliminar a infeção proporciona uma maior probabilidade desta evoluir para uma doença maligna [4]. Existem evidências que apoiam a capacidade de alguns tipos de HPV permanecerem num estado latente e a longo prazo nas células epiteliais basais, após aparente resolução da infeção. Deste modo, a infeção latente demonstrou ser um fator de risco para o desenvolvimento de uma patologia no mesmo local [5].

O Vírus do Papiloma Humano está associado a praticamente todos os cancros cervicais e uma proporção significativa de alterações anogenitais (vulvares, vaginais, penianas e anais) e orofaríngeas. Está associado de igual forma a outras lesões da pele e mucosas, como verrugas e papilomas benignos [2].

1.1.1. Estirpes de alto e baixo risco

Até à data foram sequenciados e caracterizados mais de 200 genótipos de HPV [6]. No entanto, apenas alguns apresentam potencial cancerígeno e são conhecidos por terem a capacidade de induzir cancro [7]. O facto dos diversos tipos de HPV estarem relacionados com diferentes sintomas, levou os cientistas a classificar cada tipo de HPV de acordo com a gravidade dos resultados clínicos. Assim, os tipos de HPV estão agrupados em dois grupos: baixo e elevado risco [6]. Dos vários tipos de HPV que infetam o trato anogenital, estirpes HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82 são considerados genótipos de alto risco, também conhecidos como oncogénicos e estão associados a lesões de alto grau e cancro do colo do útero invasivo. Destes, destacam-se o HPV16 e o HPV18 pela sua maior capacidade carcinogénica e são responsáveis por cerca de 70% dos carcinomas de células escamosas e mais de 90% dos adenocarcinomas. As estirpes HPV6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89 são consideradas de baixo risco ou não oncogénicas e estão associadas principalmente a verrugas genitais e lesões cervicais benignas [1].

1.1.2. Transmissão do HPV

Como já referido, a infeção por HPV é uma das DSTs mais comum, sendo o contacto sexual fundamental para a sua transmissão [8]. Contudo, a transmissão também pode ser feita através do contacto direto com a pele [9]. Os fatores de risco associados ao HPV estão claramente relacionados com alguns comportamentos dos indivíduos. A idade precoce no início das primeiras relações sexuais, múltiplos parceiros sexuais ao longo da vida, assim como contacto sexual com indivíduos de alto risco são considerados os fatores mais significativos para a transmissão do vírus [8]. Fatores adicionais conhecidos, que aumentam a probabilidade da persistência do HPV incluem o tabagismo, imunossupressão, baixo nível socioeconómico e o uso prolongado de contraceptivos orais [8].

1.2. Incidência mundial da infeção por HPV

A predominância do HPV demonstrou ser variável por região geográfica e idade, dependendo do comportamento sexual, controlo do vírus e efeitos do tratamento em locais que possuem rastreio cervical generalizado [3]. A prevalência mundial da infeção pelo HPV é estimada em 11,7% nas mulheres com achados citológicos normais, e é significativamente maior para mulheres com citologia anormal [10]. Globalmente, a

distribuição etária da infecção por HPV mostra um pico precoce de predominância em mulheres mais jovens, com menos de 25 anos, e uma diminuição em idades mais avançadas [10].

Atualmente, está estabelecida uma relação causal entre a persistência da infecção e o desenvolvimento de cancro de colo do útero. Mundialmente, os HPV16 e 18 são os mais cancerígenos e com maior associação ao desenvolvimento de cancro [10]. A fração atribuível do cancro causado pelo HPV em homens é muito menor (<1%) do que nas mulheres (8,6%), devido à vulnerabilidade única do colo do útero à carcinogénese deste vírus. Em grandes estudos epidemiológicos, o HPV de alto risco foi detetado em 85-93% das mulheres diagnosticadas com cancro do colo do útero [10]. Os genótipos mais comuns, HPV16 e 18, foram encontrados em aproximadamente 70% dos casos de cancro cervical, em 50-90% das neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) graus 2 e 3 e em 25% das NIC grau 1 [11].

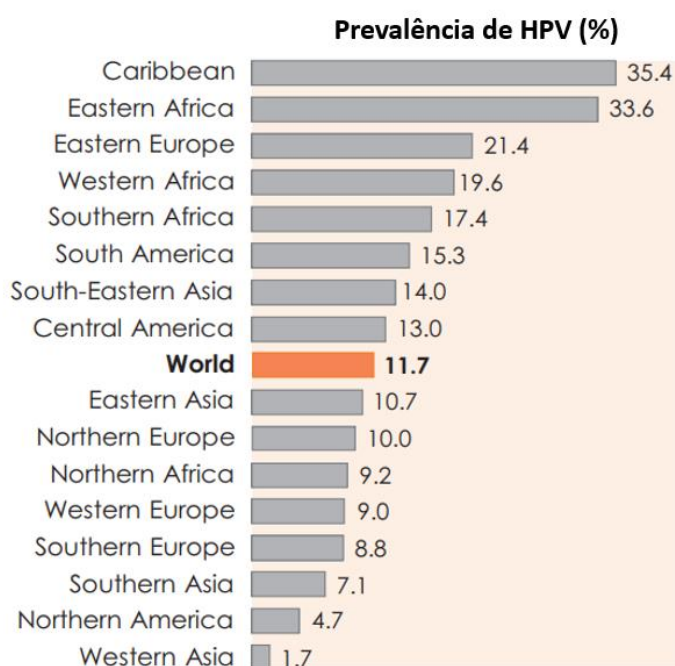


Figura 1. Prevalência do Vírus do Papiloma Humano (HPV) em mulheres com achados citológicos normais (adaptado de [12]).

1.2.1. HPV de alto risco

A prevalência mundial da infecção por HPV de alto risco é de 10,4% e pode chegar a 36,5% em alguns países em desenvolvimento [9]. Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado que o risco de contrair o vírus e cancro do colo do útero são influenciados pela atividade sexual [9]. Em geral, o HPV16 é o tipo oncogénico mais frequentemente detetado na população, sendo responsável por aproximadamente 60% dos cancros do colo do útero invasivo, seguido do HPV18 com aproximadamente 15% [3]. Além disso, o HPV16 está relacionado com 85% de todos os outros cancros não cervicais relacionados com esta infecção [3]. A carcinogenicidade incomparável do HPV16 em relação aos outros tipos de HPV de alto risco, torna-o num dos mais importantes carcinogéneos humanos [3].

Praticamente todas as neoplasias e cancros cervicais são atribuíveis a genótipos de HPV de alto risco. Aproximadamente 70% de todos os cancros cervicais estão associados aos tipos 16 e 18 [11]. O HPV16 é responsável por 50% dos carcinomas espinocelulares e 60% de todos os cancros cervicais, enquanto o HPV18 está na origem de cerca de 20% dos adenocarcinomas cervicais [11]. As principais etapas da carcinogénese cervical incluem infecção por HPV, persistência do vírus, progressão para displasia e invasão (Figura 2) [11]. Estas etapas podem ocorrer na direção inversa, incluindo a eliminação da infecção por HPV e regressão ou resolução das lesões pré-cancerígenas. Assim, a maioria destas infeções são transitórias ou autolimitadas. Aproximadamente 67% das infeções por HPV são eliminadas sem qualquer intervenção num prazo de 9 a 12 meses e mais de 90% desaparecem em 2 anos [11]. Pensa-se que uma infeção por HPV de longa duração seja responsável por desencadear NIC de forma lenta, progressiva e consecutiva [8]. Mulheres com infeção persistente de HPV16 devem, portanto, ser monitorizadas ao longo do tempo, pois correm maior risco de desenvolver lesões de alto grau ou cancro do colo do útero [11].

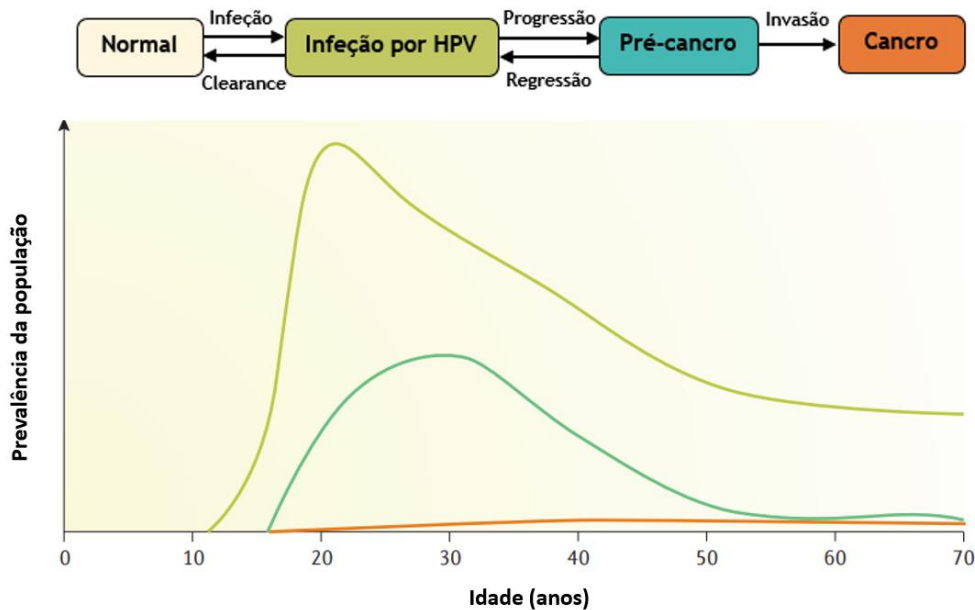


Figura 2. Modelo conceitual da infecção pelo vírus do HPV que conduz ao cancro do colo do útero (adaptado de [3]).

1.3. HPV de alto risco e o desenvolvimento de cancro

A relação entre o Vírus do Papiloma Humano (HPV) e o desenvolvimento de cancro, particularmente cancro do colo do útero, foi desenvolvida em 1983 pelo médico alemão Harald zur Hausen et al. [7]. Este grupo de investigação foi capaz de identificar o HPV16 e demonstrou a sua presença em várias biópsias tumorais malignas [7]. Posteriormente, descobriram a presença de ADN de HPV tipo 16 e tipo 18 em linhas celulares de cancro de colo do útero, assim como em biópsias de carcinoma do colo do útero [7]. Deste modo, tinham sido dados os primeiros passos para a compreensão do desenvolvimento deste cancro [7].

Alterações genéticas e epigenéticas nos genes das células hospedeiras são cruciais para a progressão de lesões pré-cancerígenas cervicais e consequente desenvolvimento de cancro do colo do útero invasivo. Embora muita investigação já tenha sido realizada para compreender o ciclo de vida do HPV e o seu papel no desenvolvimento do cancro do colo do útero, ainda há uma necessidade crítica de encontrar estratégias precisas de vigilância e opções terapêuticas direcionadas para erradicar o cancro nas mulheres afetadas [1]. A maioria das infeções por HPV não causa sintomas e são eliminadas num período de 12 a 24 meses após a aquisição da infeção. Apenas uma pequena fração dessas infeções que persistem, progridem para uma lesão pré-neoplásica ou neoplásica. No entanto, uma infeção com um genótipo de HPV de alto risco é considerada necessária para o

desenvolvimento de cancro, mas por si só não é suficiente, uma vez que a grande maioria das mulheres com infeção pelo HPV não desenvolve essa patologia [2].

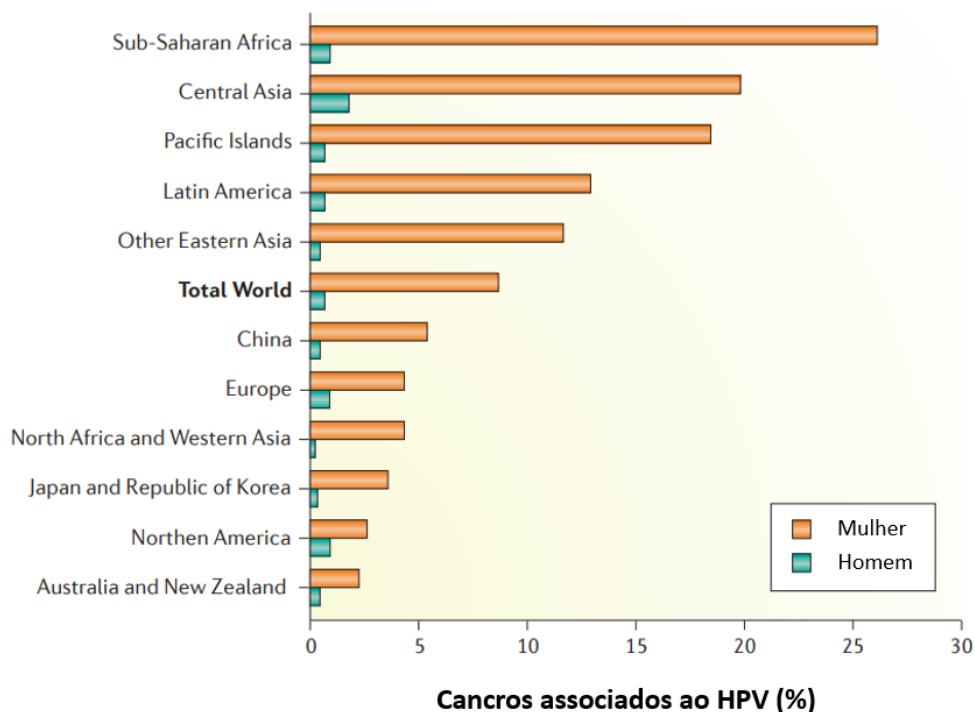


Figura 3. Fração de câncros associados ao Vírus do Papiloma Humano (HPV) por região geográfica e sexo (adaptado de [3]).

1.4. Diagnóstico de HPV e deteção de cancro do colo do útero

Na prática clínica, o exame de Papanicolau e a citologia em base líquida (CBL), combinados com o tratamento de lesões pré-cancerígenas cervicais e cancro em estadios iniciais, têm sido bem sucedidos na prevenção de até 80% dos casos de cancro cervical invasivo em todo o mundo [9]. A triagem do cancro cervical envolve testes para a infeção por HPV e lesões cervicais precursoras do cancro entre mulheres que não apresentam sintomas. Quando a triagem deteta lesões pré-cancerígenas, o tratamento pode ser facilmente instituído evitando o desenvolvimento de cancro [9].

A infeção viral por HPV é o mais importante, mas não o único fator de risco para o desenvolvimento de cancro do colo do útero, e os subtipos de alto risco associados são componentes decisivos para a progressão da doença [13]. Nos últimos anos, a deteção do HPV tornou-se gradualmente o principal método de triagem para o cancro do colo do

útero [14]. Programas nacionais de triagem em países desenvolvidos têm sido capazes de reduzir significativamente a incidência de cancro cervical nos últimos 50 anos [11]. A prevenção eficaz está ao dispor da população, incluindo a prevenção primária de cancro e verrugas anogenitais através da vacinação contra o HPV e a prevenção secundária do cancro do colo do útero através de rastreios e tratamentos precoces [5]. As vantagens da triagem primária do HPV incluem maior sensibilidade para detetar lesões pré-neoplásicas, melhor segurança com um teste negativo e prolongamento seguro dos intervalos de triagem [15].

1.4.1. Citologia convencional

A citologia cervical, também chamada de esfregaço de Papanicolau é realizada em mulheres entre os 25 e os 65 anos. Este exame tem a capacidade de caracterizar os efeitos do HPV nas células epiteliais escamosas cervicais. As infeções precoces por HPV podem ser acompanhadas por alterações leves no epitélio, detetáveis por meio de técnicas virológicas e/ou citológicas, permitindo o tratamento antecipado. O exame citológico de esfregaços cervicais pode detetar o crescimento anormal de células escamosas, denominadas lesões intraepiteliais escamosas de baixo ou alto grau, dependendo de quanto o epitélio cervical está afetado e quão anormais as células surgem [4].

1.4.2. Citologia de base líquida

Na década de 1990, os avanços na citotecnologia levaram ao desenvolvimento da citologia em base líquida (CBL). Em contraste com a aplicação de um fixador, depois que uma amostra cervical é manchada numa lâmina (como no esfregaço de Papanicolau convencional), a colheita do teste de base líquida envolve amostragem e transferência de células para um meio líquido seguido de processamento automatizado. Vários estudos não consideram diferenças consideráveis na sensibilidade ou especificidade da técnica de CBL para a deteção da NIC em comparação com a citologia convencional [8].

1.4.3. Teste de HPV

Verificou-se que os testes de HPV têm maior sensibilidade do que a citologia convencional, mas também uma menor especificidade. Assim, o teste de HPV foi mais adequado como teste de triagem [15]. É um teste realizado em laboratório, no qual as células do colo do útero são testadas para ADN de certos tipos de HPV que são conhecidos por desencadear cancro cervical. Pode ser realizado sozinho (triagem primária de HPV) ou em combinação com citologia cervical (triagem híbrida de HPV) [9].

1.4.4. Colposcopia

A colposcopia é um procedimento de diagnóstico visual, que é realizado após a detecção de alterações relevantes pela citologia do colo do útero ou quando existe um teste de HPV com resultados positivos para um certo tipo de alto risco. Este estudo permite fazer uma biópsia, posteriormente, essa amostra é analisada em laboratório de forma a determinar se existem alterações celulares e se é necessário a administração de algum tipo de tratamento [8].

1.5. S-Transferases da Glutaciona

As S-transferases da glutaciona (GSTs) são uma superfamília ubíqua, dimérica e multifuncional de enzimas, presente em todos os reinos, que desempenham um papel fundamental nas reações metabólicas de fase II [16]. Estas enzimas estão envolvidas na manutenção da integridade celular, stress oxidativo e proteção contra danos no ADN, catalisando a conjugação da glutaciona (GSH) a uma ampla variedade de substratos eletrofilicos [16]. As GSTs fornecem proteção contra toxinas por conjugação catalítica dessas mesmas toxinas com a GSH ou através da ligação passiva a várias moléculas tóxicas exógenas ou endógenas, incluindo toxinas ambientais, carcinogénicas, agentes quimioterápicos, ou produtos de stress oxidativo [16]. Desta forma, resultam produtos com maior solubilidade em água, conseqüentemente mais hidrofílicos e, por isso, mais fáceis de excretar [16]. Contudo, existem casos em que as reações de conjugação podem levar à formação de compostos muito mais tóxicos que o substrato inicial, proporcionando o desenvolvimento de inúmeras patologias. Estão igualmente envolvidas na prevenção de mutações celulares e ajudam no mecanismo de defesa antioxidante [17]. Foram originalmente descobertas no fígado de rato no início da década de 1960 e encontradas na maioria das formas de vida [16]. Desde então, as GSTs atraíram uma atenção considerável no campo da investigação devido às suas várias atividades, nomeadamente a destoxificação dos eletrófilos reativos, sinalização celular, atividade antiapoptótica e respostas anti e pró-inflamatórias [16].

Com base na localização subcelular, a superfamília das GSTs está dividida em três famílias de proteínas: citosólica ou solúvel, mitocondrial e peroxissomal, e microssomal, atualmente denominadas proteínas associadas à membrana envolvidas no metabolismo de eicosanóides e glutaciona (MAPEG) [17]. As GSTs citosólicas e mitocondriais apresentam algumas semelhanças no dobramento estrutural da proteína, enquanto as MAPEG não apresentam qualquer analogia com estas duas famílias [18]. A família das GSTs citosólicas, presente nos humanos, é a mais relevante no campo da investigação e por isso

a mais estudada. De acordo com as suas características estruturais, químicas e físicas, esta família encontra-se dividida em sete classes: alpha (α), mu (μ), kappa (κ), pi (π), theta (θ), ômega (Ω) e zeta (ζ) [19]. As quatro GSTs mais amplamente estudadas (GSTA, GSTM, GSTP e GSTT), pertencentes a esta família estão envolvidas na destoxificação de xenobióticos, carcinogênicos e drogas terapêuticas [17]. São extensivamente estudadas como possíveis biomarcadores, uma vez que alguns dos seus estados polimórficos podem aumentar a suscetibilidade do indivíduo ou da população a uma patologia, como por exemplo o cancro [17]. Polimorfismos genéticos em genes que codificam estas enzimas, podem interferir com a sua atividade enzimática [13].

1.5.1. Mecanismo de ação das GSTs

As S-transferases da glutathione atuam de forma a minimizar os danos oxidativos celulares, modulando a ação de outras enzimas e proteínas importantes para a manutenção da integridade genómica [13]. As GSTs são capazes de formar múltiplas reações com uma variedade de substratos endógenos e exógenos, as suas isoformas têm uma relação concreta com os oxidantes, são excelentes marcadores de stress oxidativo que protegem a célula dos radicais livres e a sua atividade pode destoxificar uma vasta gama de substâncias perigosas [20].

Nas reações de fase II ocorre a desativação de metabolitos xenobióticos através da conjugação (ligação covalente) com moléculas hidrofílicas endógenas, como a glutathione. Os conjugados solúveis formados na água, são exportados por componentes sub-celulares, impedindo a sua interferência com a atividade enzimática [20]. O sítio ativo de uma proteína GST é formado pelo sítio de ligação da glutathione, que é preservado nas diferentes classes, e o sítio de ligação do substrato hidrofóbico, que apresenta variações nos resíduos formadores, levando a uma ampla especificidade do substrato [20]. A reação de destoxificação executada pelas GSTs envolve três fases. Numa primeira fase, ambos os compostos endógenos (GSH) e exógenos (xenobióticos) ligam-se aos sítios relevantes dos substratos. Na segunda fase, a GSH é conjugada com o composto xenobiótico formando um complexo altamente solúvel em água (destoxificado). Por fim, na terceira fase, o complexo destoxificado é eliminado [20].

Certas isoformas das GSTs podem ser encontradas no núcleo, sugerindo proteção nuclear contra a ação de compostos alquilantes e peróxidos orgânicos, protegendo o conteúdo do ADN [20]. Algumas células cancerígenas são resistentes a medicamentos quimioterápicos através da expressão das subfamílias específicas das GSTs. Deste modo, é fundamental a identificação dessas mesmas subfamílias que se expressam em resposta a certos tumores. No cancro, a metabolização e destoxificação de medicamentos quimioterápicos e carcinogênicos são as principais funções das GSTs. Tanto o aumento

dos níveis das GSTs como de GSH pode melhorar a conjugação de quimioterapêuticos e consequente resistência aos mesmos [20].

As S-transferases da glutathiona humanas desempenham um papel importante na defesa celular contra compostos exógenos através de dois mecanismos de ação diferentes. O primeiro é através da destoxificação de carcinogêneos como o benzopireno ou agentes quimioterapêuticos, catalisando a redução desses compostos por meio da conjugação com a glutathiona [21]. Portanto, os doentes podem diferir na resposta à quimioterapia e à radioterapia, dependendo da atividade das GSTs. No segundo mecanismo, alguns genótipos das GSTs foram associados a padrões característicos de alterações somáticas no tecido tumoral; se os doentes com genótipos GST de baixa atividade são mais propensos a ter certas alterações somáticas, e se essas alterações representam fenótipos tumorais mais agressivos, as diferenças nos genótipos das GSTs de cada indivíduo podem ter um impacto na sua sobrevivência [21].

1.5.2. GSTM1

A classe μ está localizada no cromossoma 1 e é conhecida por modificar a toxicidade e a eficácia de certos medicamentos. Existem cinco genes pertencentes a esta classe, sendo eles GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4 e GSTM5. A glutathiona S-transferase mu 1 (GSTM1) é codificada por um gene localizado no cromossoma 1p13.3 [18] e tem uma variante funcional comum, nulo versus presente, sendo que o genótipo nulo se caracteriza pela deleção total do gene. A frequência desta deleção está entre 23% e 63%, dependendo da população estudada [22]. O gene GSTM1 é capaz de codificar a enzima GSTM1, de fase II, responsável por destoxificar vários xenobióticos. A deleção homozigótica do gene GSTM1 (GSTM1 nulo), origina a não codificação da proteína GSTM1, logo total ausência da sua atividade enzimática [17].

Esta S-transferase da glutathiona tem também uma função crucial nos sistemas antioxidantes existentes no organismo. Deste modo, o seu papel na etiologia e progressão de determinadas doenças tem vindo a suscitar um interesse gradual, levando ao aparecimento de mais estudos relacionados com esta temática. Por esta razão, o gene GSTM1 tem vindo a ser estudado no âmbito da sua possível relação com o risco de desenvolvimento de diversas patologias, principalmente do polimorfismo nulo do GSTM1, que tem sido relacionado com o risco de desenvolvimento de diversos cancros [18].

A presença do genótipo nulo do GSTM1 compromete a destoxificação celular, uma vez que a metabolização de substâncias tóxicas fica reduzida, favorecendo assim a carcinogénese [13]. Genótipos de várias classes de GSTs podem produzir efeitos distintos quando associados com o vírus e outros genes, e a compreensão desta relação poderia ajudar a interpretar a evolução patológica da doença. Os produtos do gene GSTM1

facilitam a conjugação e eliminação de várias espécies eletrofílicas, como os radicais livres, minimizando alterações na estrutura do ADN [13]. A atividade enzimática insuficiente, combinada com a infecção viral de alto risco, pode conduzir a resultados de prognóstico mais graves [13].

Uma meta-análise revelou que o genótipo nulo GSTM1, aumenta o risco de lesões cervicais, inclusive em mulheres com HPV [13]. Infecção com subtipos de alto risco, como o HPV16, pode favorecer o desenvolvimento de patologias com potencial de gravidade do colo do útero, mesmo desencadeadas por alterações no genoma do hospedeiro. [13].

1.6. GSTs e o desenvolvimento de cancro de colo do útero promovido pelo HPV

Os carcinogêneos ambientais são conhecidos por gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células. Existem evidências que o stress oxidativo promove danos nos componentes celulares que desempenham um papel crucial no desenvolvimento do cancro [19].

Polimorfismos genéticos podem levar a variações na atividade das enzimas, resultando em combinações que variam de deleções parciais a completas, o que pode resultar num genótipo nulo. A glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1) e a glutathione S-transferase teta 1 (GSTT1) apresentam variantes polimórficas nulas por deleção completa, também chamadas de genótipos nulos, que resultam na ausência completa da função enzimática em ambos os casos [23]. As variantes polimórficas nulas dos genes do metabolismo xenobiótico (GSTM1 e GSTT1) têm sido associadas a um risco acrescido para o desenvolvimento de alguns cancros como o cancro da próstata, rim, nasofarínge, pulmão, mama, colo do útero, leucemia mieloide aguda e carcinoma hepatocelular [13]. Vários estudos identificaram associações entre genótipos nulos da GSTM1 e GSTT1 e o possível risco de desenvolvimento de cancro do colo do útero em diferentes populações [13].

Uma recente meta-análise, identificou que o genótipo nulo da GSTM1 aumenta o risco de lesões, inclusive em mulheres com HPV [13]. No entanto, os estudos que investigam a relação entre a infecção viral e estes polimorfismos ainda são bastante limitados [13]. Outro estudo realizado, demonstrou que o genótipo nulo de GST resultou na perda completa da capacidade da enzima se ligar a substratos genotóxicos [24]. Isso implica uma diminuição da capacidade de destoxificação, uma redução na taxa metabólica de substâncias tóxicas intracelulares e conseqüente aumento da transformação maligna de células, promovendo a carcinogénese [24]. A deleção de um ou ambos os genes em mulheres com os subtipos mais agressivos conferem pior prognóstico de patologias cervicais. Por outro lado, a

deleção de um ou ambos os genes e a interação com outros correlacionam-se em mulheres com os subtipos mais agressivos e apontam para um melhor prognóstico de patologias cervicais [25]. Um estudo realizado na população indiana, verificou uma maior frequência de alelos nulos da GSTM1 e da GSTT1 em mulheres com cancro do colo do útero e infetadas com o vírus [25]. Vários estudos executados, identificaram um número significativo de HPVs de alto risco associados a lesões cervicais, para além dos tipos 16 e 18 [13]. Assim, torna-se cada vez mais importante perceber se existe alguma relação entre a deleção dos genes GSTM1 e GSTT1 e a infeção por HPV na aquisição de lesões pré-cancerígenas associadas ao cancro do colo do útero [13].

2.Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho de investigação teve como objetivo principal determinar os genótipos presente e nulo do gene GSTM1 em mulheres com lesões no colo do útero e analisar a possível relação com o HPV.

2.2. Objetivos específicos

- Detetar a presença de HPV e respetiva estirpe em lâminas de blocos parafinado de mulheres com lesões no colo do útero;
- Identificar os genótipos presente e nulo do GSTM1 em lâminas de blocos parafinado de mulheres com lesões do colo do útero;
- Correlacionar os genótipos do GSTM1 com a estirpe de HPV identificada nas lesões.

3. Materiais e métodos

3.1. População em estudo

O grupo de indivíduos em estudo é composto por 45 mulheres, com lesões no colo do útero, do Departamento de Saúde da Mulher, Divisão de Oncologia Ginecológica do Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira (CHUCB), Covilhã-Portugal. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira. Foi obtido o consentimento informado de todas as mulheres que aceitaram participar na investigação. Das 45 amostras estudadas, foi possível extrair ADN de 44, e para deteção do polimorfismo da GSTM1 foram utilizadas 37 amostras.

3.2. Procedimentos laboratoriais

3.2.1. Extração de ADN de tecido montado em lâminas parafinado

A extração de ADN foi efetuada a partir de tecido de lâminas parafinado, recorrendo à utilização do kit de extração *QIAamp® DNA FFPE Tissue*, seguindo as instruções do fabricante com auxílio do protocolo do Instituto Português de Oncologia, sujeito a algumas alterações pelo nosso grupo de investigação.

De forma a remover a parafina, a amostra foi colocada num falcon contendo xileno, até a lâmina ficar coberta (7 min de incubação à temperatura ambiente) e, em seguida, foi transferida para um novo falcon onde foi coberta com etanol absoluto (5 min de incubação à temperatura ambiente). Posteriormente, retirou-se a lâmina do etanol e deixou-se secar à temperatura ambiente, verificando se a parafina tinha sido completamente removida. Após a desparafinação, o tecido foi raspado da lâmina com o auxílio de um bisturi para um eppendorf devidamente identificado. Foram utilizados 180 µL de Buffer ATL e 20 µL de Proteinase K para ressuspender o pellet (agitação no vórtex e incubação no bloco de aquecimento a 56°C durante 60 min). Depois disso, fez-se nova agitação no vórtex e posterior incubação a 90°C durante 60 min (ou até a lise estar completa). O eppendorf foi retirado do bloco e deixado a arrefecer até à temperatura ambiente e de seguida efetuou-se uma centrifugação para remover o excesso de líquido contido na tampa. Pipetaram-se 200 µL de Buffer AL e 200 µL de etanol absoluto e de seguida todo o lisado foi transferido para a coluna (centrifugação durante 2 min a 8.000 rpm). A coluna foi colocada num novo tubo de recolha, onde foram adicionados 500 µL de Buffer AW1 (centrifugação a 8.000 rpm durante 1 min). O conteúdo do tubo de recolha foi rejeitado e a coluna foi colocada novamente no mesmo tubo, tendo sido adicionados 500 µL de Buffer AW2 (centrifugação

a 8.000 rpm durante 1 min). Seguidamente, a coluna foi colocada num tubo de recolha e centrifugada de forma a secar a membrana filtrante (14.000 rpm durante 3 min). A mesma coluna foi colocada num tubo de eluição já rotulado e foram adicionados 50 µL de Buffer ATE no centro da coluna sem tocar na membrana (incubação durante 5 min à temperatura ambiente, seguida de centrifugação a 14.000 rpm durante 1 min). Por fim, o eluato do eppendorf era o “stock” de ADN, que podia ser armazenado a 2-8°C durante 2 semanas ou -20°C durante 60 dias (Figura 4).



Figura 4. Esquema da extração de ADN de tecido montado em lâminas parafinado de acordo com o kit *QIAamp® DNA FFPE Tissue*.

3.2.2. Identificação da estirpe de HPV

A identificação das estirpes de HPV de cada amostra, foi realizada no CHUCB, Covilhã-Portugal, executada através do sistema *Anyplex™ II HPV HR Detection* (*Anyplex HR*; *Seegene, Seoul, Korea*), no equipamento *CFX96™ Real-time PCR System* (*Bio-Rad*) e seguindo as instruções do fabricante.

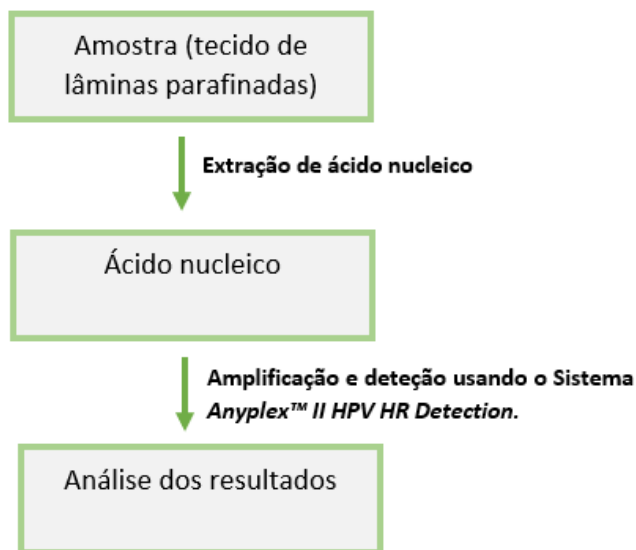


Figura 5. Esquema do método para a identificação das estirpes de HPV de acordo com o sistema *Anyplex™ II HPV HR Detection*.

Tabela 1: Características das 45 mulheres com lesões na cérvix uterina avaliadas no estudo.

<i>Idade mínima</i>	24
<i>Idade máxima</i>	82
<i>Média das idades</i>	40,6
<i>HPV negativo (n=37)</i>	4
<i>HPV positivo (n=37)</i>	33
<i>GSTM1 present (n=37)</i>	27
<i>GSTM1 null (n=37)</i>	10

3.2.3. Identificação do genótipo do GSTM1 por PCR em tempo real

A genotipagem do GSTM1 foi realizada através do PCR em tempo real, com a co-amplificação de um fragmento do gene da β -globina, que serviu como controlo positivo, uma vez que o gene da β -globina é um *housekeeping gene*. O ensaio de PCR em tempo real foi realizado para todas as amostras para identificação do genótipo do GSTM1, no equipamento *CFX Connect™ RealTime PCR Detection System (Bio-Rad)*.

Para tal, obteve-se um volume final de reação de 19 μ L/amostra, contendo 0,6 μ L de cada *primer* (Tabela 1), 10 μ L de SYBR Green qPCR Master Mix, 7,8 μ L de água autoclavada e 2 μ L de ADN genómico extraído. A amplificação foi efetuada no equipamento *MyCycler Thermal Cycler da BioRad®*, com pré-incubação da mistura de reação durante 10 min a 95°C. Após este período, as condições de incubação consistiram na realização de 70 ciclos de PCR durante 10 seg a 95°C, 10 seg a 58°C, seguindo-se 20 seg a 72°C. Por fim, a temperatura da reação foi aumentada até 95°C a uma taxa de 0,1°C/s, iniciando em 68 °C por 15 seg.

Tabela 2: Primers utilizados para a amplificação da região polimórfica do GSTM1.

Primers	Sequência	Referência bibliográfica
<i>Forward Primer GSTM1</i>	5'-GAACTCCCTGAAAAGCTA AAG-3'	[26]
<i>Reverse Primer GSTM1</i>	5'- GTTGGGCTCAAATATACG GTGG-3'	
<i>Forward Primer β-globina</i>	5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3'	[26]
<i>Reverse Primer β-globina</i>	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'	

3.2.4. Análise estatística

O método de regressão logística foi utilizado para obter odds ratio (ORs) e intervalos de confiança a 95% (CI 95%) como estimativas de risco relativo. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os cálculos foram efetuados com recurso ao software informático *IBM SPSS Statistics versão 28 for Windows*. No presente estudo, 37 mulheres foram genotipadas para o polimorfismo presente/nulo do GSTM1 através da técnica de PCR em tempo real. Os genótipos são classificados como presentes quando apresentavam uma ou duas cópias do gene relevante e nulos quando apresentavam deleções homozigóticas.

4. Análise de resultados

A identificação dos genótipos foi feita com o programa *CFX Connect™ RealTime PCR Detection System (Bio-Rad)*, de forma a confirmar a correta distinção dos dois genótipos possíveis (presente/nulo). As figuras que se seguem, mostram as curvas de *melting* de duas amostras diferentes, quando o GSTM1 está presente (Figura 6) e quando está deletado (Figura 7).

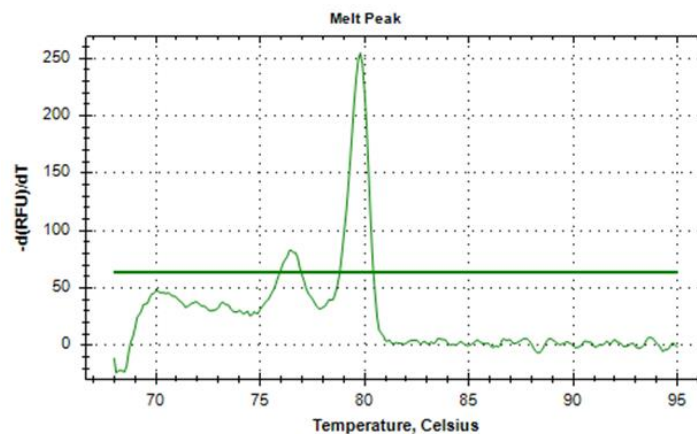


Figura 6: Curva de *melting* da amostra número 16, que possui genótipo presente.

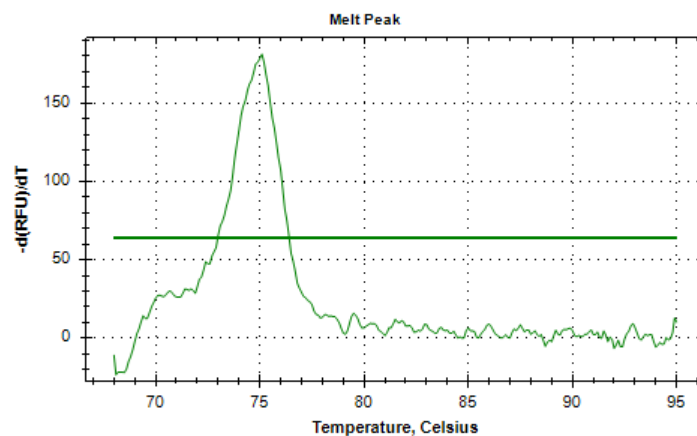


Figura 7: Curva de *melting* da amostra número 29, que possui genótipo nulo.

A distribuição dos genótipos do GSTM1 identificados nas mulheres com lesões cervicais, encontra-se apresentada na Tabela 3. A deleção do gene GSTM1 encontrou-se em 24.3% das mulheres com menos de 50 anos e em 2.7% das mulheres com idade igual ou superior a 50 anos. Perante esta análise, concluiu-se que a deleção do GSTM1 predomina em mulheres com menos de 50 anos.

Tabela 3: Relação entre os genótipos do GSTM1 e a idade.

	Idade		OR (IC 95%) ^a	p-Value
	<50 n (%)	≥50 n (%)		
GSTM1	Presente	23 (62.2)	4 (10.8)	1
	Nulo	9 (24.3)	1 (2.7)	0.639 [0.063 – 6.520]

^a OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança

A Tabela 4 apresenta a distribuição de HPV nas mulheres com idade inferior e idade igual ou superior a 50 anos. A presença de HPV foi observada em 75.7% das mulheres com idade inferior a 50 anos e em 13.5% das mulheres com idade igual ou superior a 50 anos. Face a estes resultados, verifica-se que há uma predominância da infecção por HPV em mulheres com idade inferior a 50 anos.

Tabela 4: Relação entre a prevalência de HPV e a idade.

	Idade		OR (IC 95%) ^a	p-Value
	<50 n (%)	≥50 n (%)		
HPV	Ausente	4 (10.8)	0 (0.0)	1
	Presente	28 (75.7)	5 (13.5)	1.179 [1.020 – 1.361]

^a OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança

A Tabela 5 contém a distribuição dos genótipos do gene GSTM1, tendo em consideração a presença ou ausência das estirpes de HPV em estudo. A presença do GSTM1 juntamente com a presença de HPV observou-se em 64.9% das mulheres. A deleção do GSTM1 juntamente com a presença de HPV verificou-se em 24.3% das mulheres. Analisando estes resultados, há uma predominância de mulheres com HPV e

genótipo presente para o GSTM1 (OR=1.125; 95% IC= 0.103-12.269; p=0.923). Conclui-se que a deleção do GSTM1 não parece estar associada a maior número de infecções.

Tabela 5: Relação ente a prevalência de HPV e os genótipos GSTM1.

	HPV ausente, n (%)	HPV presente, n (%)	OR (IC 95%) ^a	p-Value
GSTM1 presente	3 (8.1)	24 (64.9)	1	
GSTM1 nulo	1 (2.7)	9 (24.3)	1.125 [0.103 – 12.269]	0.923

^a OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança

Na Tabela 6 estudou-se a relação de uma estirpe de HPV com os genótipos GSTM1. Das mulheres identificadas com uma estirpe de HPV, 64.3% tinham genótipo presente para o GSTM1 e 21.4% tinham genótipo nulo (OR=1.000; 95% IC= 0.087-11.525; p=1.000). Verifica-se que existe predominância de mulheres com presença de apenas uma estirpe de HPV do que mulheres identificadas com duas estirpes (Tabela 8), e também não parece haver relação entre a presença de uma estirpe de HPV e a presença da mutação de deleção do GSTM1.

Tabela 6: Relação entre a presença de uma estirpe de HPV e os genótipos GSTM1.

	HPV ausente, n (%)	1 estirpe de HPV, n (%)	OR (IC 95%) ^a	p-Value
GSTM1 presente	3 (10.7)	18 (64.3)	1	
GSTM1 nulo	1 (3.6)	6 (21.4)	1.000 [0.087 – 11.525]	1.000

^a OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança

Na Tabela 7, analisou-se a presença da estirpe HPV 16 com os genótipos GSTM1. Verificou-se que 59.1% das mulheres diagnosticadas com HPV tipo 16 apresentavam genótipo presente para o GSTM1, enquanto 22.7% apresentava genótipo nulo. Face aos resultados obtidos, a estirpe de HPV tipo 16 encontrou-se com predominância em

mulheres que apresentavam genótipo presente para o GSTM1 (OR=1.154; 95% IC= 0.096-13.877; p=0.910). Assim, a presença da estirpe oncogénica HPV16 parece não ter associação com a deleção do gene GSTM1, e logo com a ausência de atividade da respetiva proteína.

Tabela 7: Relação entre a presença da estirpe de HPV16 e os genótipos GSTM1.

	HPV ausente, n (%)	HPV 16, n (%)	OR (IC 95%)^a	p-Value
GSTM1 presente	3 (13.6)	13 (59.1)	1	
GSTM1 nulo	1 (4.6)	5 (22.7)	1.154 [0.096 – 13.877]	0.910

^a OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança

Na Tabela 8, analisou-se a presença simultânea de duas estirpes diferentes de HPV na mesma amostra e os genótipos GSTM1. A presença de duas estirpes de HPV juntamente com genótipo presente para o GSTM1 foi identificada em 41.7% das mulheres e em 25.0% quando o genótipo para o GSTM1 era nulo (OR=1.800; 95% IC= 0.124-26.196; p=0.665). Assim, parece não existir uma diferença significativa na identificação de duas estirpes diferentes de HPV e o genótipo do GSTM1.

Tabela 8: Relação entre a presença de duas estirpes diferentes de HPV e os genótipos GSTM1.

	HPV ausente, n (%)	2 estirpes de HPV, n (%)	OR (IC 95%)^a	p-Value
GSTM1 presente	3 (25.0)	5 (41.7)	1	
GSTM1 nulo	1 (8.3)	3 (25.0)	1.800 [0.124 – 26.196]	0.665

^a OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança

5. Discussão dos resultados

No presente estudo, identificaram-se os genótipos do gene GSTM1 em 37 amostras de mulheres diagnosticadas com lesões no cérvix, assim como identificação das eventuais estirpes de HPV presentes. Foram realizadas associações dos genótipos do polimorfismo presente e nulo do GSTM1 com a infecção por HPV.

Perante os resultados obtidos, a deleção do GSTM1 verifica-se maioritariamente em mulheres com idade inferior a 50 anos (24.3%). No que diz respeito ao genótipo GSTM1, existem estudos que sugerem que a sua deleção está associada a uma maior suscetibilidade de desenvolvimento de cancro do colo do útero [24]. Embora o genótipo nulo do GSTM1 esteja associado a alguns cancros, estudos epidemiológicos anteriores sobre as GSTs e a neoplasia do colo do útero não encontraram diferenças significativas na frequência do GSTM1 quando compararam mulheres com cancro com mulheres com patologia cervical normal [27]. Face aos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a deleção do gene GSTM1 não parece estar associado a um maior número de infeções.

Verificou-se uma maior prevalência de HPV em mulheres com idade inferior a 50 anos (75.7%). Mulheres mais jovens são mais suscetíveis a serem portadoras da infeção [10]. De um modo geral, a distribuição etária da infeção mostra um pico precoce de predominância em mulheres mais jovens e uma diminuição em idades mais avançadas [10].

Confirmou-se um maior número de mulheres com HPV e genótipo presente para o GSTM1 (64.3%) comparando com mulheres que apresentavam genótipo nulo. Estes resultados não vão de encontro aos de Bortolli et al., onde foi verificada que a ausência do GSTM1 está associada a uma maior probabilidade de desenvolver uma patologia, nomeadamente cancro do colo do útero [13]. Numa recente meta-análise, verificaram que genótipo nulo para o GSTM1 aumenta o risco de lesões cervicais, inclusive em mulheres diagnosticadas com HPV [13]. Existem resultados que reforçam que a ausência do alelo GSTM1 pode estar relacionada com lesões cervicais pré-cancerígenas mais graves, especialmente em infeções por HPV de alto risco [13]. A infeção por subtipos de HPV de alto risco, como o HPV16, já foi associada ao genótipo nulo para o GSTM1, podendo ser uma causa para o desenvolvimento de patologias cervicais. Lee et al., encontraram uma associação entre o alelo nulo do GSTM1 e a probabilidade de desenvolvimento de cancro do colo do útero num estudo com mulheres coreanas. Sudenga et al., verificaram que a infeção por HPV16 estava associada aos alelos nulos do GSTM1 e do GSTT1, sendo que o GSTM1 foi associado a uma menor persistência (ou maior eliminação) do subtipo de alto risco [25]. Os resultados do estudo de Kim et al., verificaram que as mulheres com menos

de 40 anos, infetadas com HPV de alto risco, têm uma maior probabilidade de apresentarem genótipo nulo para o GSTM1 [13].

A presença de HPV de alto risco, nomeadamente HPV16, foi previamente associada ao genótipo nulo do GSTM1, podendo ser um fator desencadeador do desenvolvimento de cancro do colo do útero [25]. Nesta publicação, verificou-se uma predominância da estirpe de HPV16 em mulheres portadoras do GSTM1, o que não é corroborado pelos nossos resultados. Face aos resultados obtidos neste estudo, verificou-se uma predominância (59.1%) da estirpe de HPV16 em mulheres com genótipo GSTM1 presente. Posto isto, averigua-se que a presença da estirpe oncogénica HPV16 não tem associação com a ausência de atividade do GSTM.

Por fim, estudou-se a relação entre a presença de uma estirpe e de duas estirpes diferentes de HPV. Analisando os resultados, há uma maior predominância de mulheres com uma só estirpe de HPV (64.3%). Os nossos resultados indicam que parece não haver nenhuma relação significativa de associação de mais que uma estirpe de HPV com a presença ou ausência do gene GSTM1.

6. Conclusão e perspectivas futuras

Com o presente estudo, pretendeu-se avaliar uma possível relação entre os genótipos presente e nulo do gene GSTM1 e a infeção por estirpes de alto risco de HPV, em mulheres com lesões no colo do útero.

Os resultados, como já referido, não vão de encontro aos de outros grupos de investigação. No entanto, salienta-se que a maioria dos casos com genótipo nulo GSTM1 (9 casos) apresente lesão por estirpes de alto risco de HPV e só um caso com genótipo nulo do GSTM1 não apresenta infeção por HPV. Assim, existem vários fatores que podem contribuir para as diferenças entre os resultados apresentados e os descritos na literatura, entre eles o perfil genético da população em estudo e também o número de amostras.

Assim, e face a esta diferença de valores (9 casos com genótipo nulo GSTM1 e com infeção por HPV, 1 caso com genótipo nulo e sem infeção por HPV) é pertinente dar continuidade ao presente estudo. Futuramente, o aumento do número de amostras é uma das abordagens possíveis e também o seguimento das doentes em estudo, pois o desenvolvimento, ou não, de cancro do colo útero, pode ser uma variável fundamental para analisar se há uma associação entre genótipos do GSTM1/presença de estirpes de alto risco por HPV/desenvolvimento de cancro do colo do útero.

7. Referências Bibliográficas

1. Gupta, S.M. and J. Mania-Pramanik, *Molecular mechanisms in progression of HPV-associated cervical carcinogenesis*. J Biomed Sci, 2019. **26**(1): p. 28.
2. de Sanjose, S., M. Brotons, and M.A. Pavon, *The natural history of human papillomavirus infection*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2018. **47**: p. 2-13.
3. Schiffman, M., et al., *Carcinogenic human papillomavirus infection*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16086.
4. Hutter, J.N. and C.F. Decker, *Human papillomavirus infection*. Dis Mon, 2016. **62**(8): p. 294-300.
5. Dunne, E.F. and I.U. Park, *HPV and HPV-associated diseases*. Infect Dis Clin North Am, 2013. **27**(4): p. 765-78.
6. Farahmand, M., et al., *Prevalence and genotype distribution of genital human papillomavirus infection in female sex workers in the world: a systematic review and meta-analysis*. BMC Public Health, 2020. **20**(1): p. 1455.
7. Almeida, A.M., et al., *Cervical cancer and HPV infection: ongoing therapeutic research to counteract the action of E6 and E7 oncoproteins*. Drug Discov Today, 2019. **24**(10): p. 2044-2057.
8. Bedell, S.L., et al., *Cervical Cancer Screening: Past, Present, and Future*. Sex Med Rev, 2020. **8**(1): p. 28-37.
9. Okunade, K.S., *Human papillomavirus and cervical cancer*. J Obstet Gynaecol, 2020. **40**(5): p. 602-608.
10. Scott-Wittenborn, N. and C. Fakhry, *Epidemiology of HPV Related Malignancies*. Semin Radiat Oncol, 2021. **31**(4): p. 286-296.
11. Stuebs, F.A., et al., *Human papilloma virus genotype distribution in women with premalignant or malignant lesions of the uterine cervix*. Arch Gynecol Obstet, 2021. **304**(3): p. 751-758.
12. Forman, D., et al., *Global burden of human papillomavirus and related diseases*. Vaccine, 2012. **30 Suppl 5**: p. F12-23.
13. Bortolli, A.P.R., et al., *Relationship between GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and HPV infection: a systematic review*. Mol Biol Rep, 2021. **48**(9): p. 6631-6636.
14. Hu, Z. and D. Ma, *The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications*. Cancer Med, 2018. **7**(10): p. 5217-5236.
15. Bhatla, N. and S. Singhal, *Primary HPV screening for cervical cancer*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2020. **65**: p. 98-108.

16. Chatterjee, A. and S. Gupta, *The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer*. *Cancer Lett*, 2018. **433**: p. 33-42.
17. Hollman, A.L., P.B. Tchounwou, and H.C. Huang, *The Association between Gene-Environment Interactions and Diseases Involving the Human GST Superfamily with SNP Variants*. *Int J Environ Res Public Health*, 2016. **13**(4): p. 379.
18. Dasari, S., et al., *Genetic polymorphism of glutathione S-transferases: Relevance to neurological disorders*. *Pathophysiology*, 2018. **25**(4): p. 285-292.
19. Singh, R.R. and K.M. Reindl, *Glutathione S-Transferases in Cancer*. *Antioxidants (Basel)*, 2021. **10**(5).
20. Dasari, S., et al., *Role of glutathione S-transferases in detoxification of a polycyclic aromatic hydrocarbon, methylcholanthrene*. *Chem Biol Interact*, 2018. **294**: p. 81-90.
21. Ramos Hernandez, C., et al., *Deletion of GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer survival: a systematic review*. *Tumori*, 2017. **103**(4): p. 338-344.
22. Alves, M.M.C., et al., *Women with polycystic ovary syndrome and other causes of infertility have a higher prevalence of GSTT1 deletion*. *Reprod Biomed Online*, 2020. **41**(5): p. 892-901.
23. Pacholak, L.M., et al., *Polymorphisms in GSTT1 and GSTM1 genes as possible risk factors for susceptibility to breast cancer development and their influence in chemotherapy response: a systematic review*. *Mol Biol Rep*, 2020. **47**(7): p. 5495-5501.
24. Tian, S., et al., *Polymorphic variants conferring genetic risk to cervical lesions support GSTs as important associated loci*. *Medicine*, 2019. **98**(41).
25. Bortolli, A.P.R., et al., *GSTT1 and GSTM1 polymorphisms with human papillomavirus infection in women from southern Brazil: a case-control study*. *Mol Biol Rep*, 2022. **49**(7): p. 6467-6474.
26. Almeida, M., et al., *Prognosis of hormone-dependent breast cancer seems to be influenced by KEAP1, NRF2 and GSTM1 genetic polymorphisms*. *Mol Biol Rep*, 2019. **46**(3): p. 3213-3224.
27. Nunobiki, O., et al., *GSTM1, GSTT1, and NQO1 polymorphisms in cervical carcinogenesis*. *Hum Cell*, 2015. **28**(3): p. 109-13.