

Análise da influência dos genótipos do gene GSTT1 no desenvolvimento de lesão por HPV

Cíntia Maia de Sousa

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

Orientador: Prof.^a Doutora Ana Cristina Ramalinho Tavares Patrício
Co-orientador: Prof.^a Doutora Luiza Augusta Tereza Gil Beitenfeld
Co-orientador: Mestre Micaela Carina Pereira Almeida

junho 2023

Declaração de Integridade

Eu, Cíntia Maia de Sousa, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M11998 de/o Bioquímica da Faculdade 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

Quero dedicar esta dissertação a todos aqueles que não me deixaram desistir e em especial aos meus avós.

“A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas o que é que isso tem? Temos que ter perseverança e, acima de tudo, confiança em nós próprios.”

Marie Curie

Agradecimentos

A realização desta dissertação fez-me perceber que a maioria das vezes somos, mais fortes do que aquilo que imaginamos ser e que também, precisamos muito do apoio daqueles que nos são mais próximos. Por todos aqueles que caminharam a meu lado e me ajudaram a alcançar este objetivo, um obrigada.

Agradeço à Professora Doutora Ana Ramalinho, por ter aceite ser minha orientadora e por me ter aberto as portas a esta jornada. Obrigada por me receber sempre com um sorriso no rosto e por estar sempre disponível para ajudar. Obrigada por me ter orientado quando eu me encontrava meia perdida e por ter sempre uma palavra de incentivo para dizer.

Agradeço à minha co-orientadora, Mestre Micaela Almeida, por toda a disponibilidade, ajuda e apoio indispensável à realização desta dissertação. Por todas as dúvidas esclarecidas, por responder a todas as mensagens e por se mostrar sempre presente nesta caminhada, um grande obrigada, por me ajudar a alcançar esta etapa.

Agradeço à minha co-orientadora, Professora Doutora Luiza Granadeiro, pelo seu envolvimento neste projeto e por mostrar sempre estar disponível para esclarecer alguma dúvida e por dar sempre uma palavra de força.

Agradeço à minha parceira de laboratório, Lara Silva. A Lara tem acompanhado a minha jornada desde o primeiro ano de Licenciatura. Obrigada por me ajudares a acreditar quando eu pensava que não ia conseguir. Obrigada pelas mensagens e chamadas partilhadas e por me fazeres ver que sou capaz e não me deixares baixar os braços. Obrigada por estares do meu lado.

Agradeço a todos os meus amigos da Covilhã e de Viseu que fizeram parte desta viagem, em especial à Mariana Veiga, graças a ti não desisti deste meu grande objetivo. Obrigada por me teres dado a força e a motivação para eu seguir em frente.

Não poderia deixar de agradecer especialmente ao Eduardo. Obrigada por seres o meu porto de abrigo e por acreditares sempre em mim quando eu não acredito. Obrigada pelo amor, carinho e pela força que me dás todos os dias. Obrigada por tornares esta viagem mais feliz e por me lembrares todos os dias do que eu sou capaz. Sem ti do meu lado, não seria possível.

Por fim, mas não menos importante agradeço à minha família. Agradeço à minha mãe e ao meu padrasto por me terem colocado neste caminho e por me incentivarem sempre a continuar. Agradeço à minha irmã por estar sempre do meu lado e por dizer sempre que eu ia conseguir, é por ela que eu vou sempre lutar. Um obrigado aos meus avós emprestados, pais do meu padrasto, por me ajudarem sempre no que eu precisava e por não me deixarem faltar nada, por me apoiarem sempre. Obrigado aos pais do meu namorado, por me fazerem sentir parte da família e por me ajudarem e apoiarem em todas as etapas, em especial à D. Isabel que tem sempre uma palavra de amor para oferecer.

Avó e avô, nem sempre foi fácil seguir em frente, mas sei que continuam presentes de outra forma e que iluminam o meu caminho todos os dias. Gostava que estivessem presentes nesta conquista. Espero continuar a deixar-vos orgulhosos, obrigado por me ajudarem a tornar a mulher que sou hoje.

Um sentido e enorme obrigado, a todos vocês que me ajudaram a alcançar esta etapa tão importante da minha vida.

Resumo

O cancro do colo do útero é um dos cancros mais comuns na população feminina. Esta neoplasia pode desenvolver-se a partir de lesões intraepiteliais que podem ter origem em infeções persistentes por HPV de alto risco. Estas infeções se não forem detetadas e tratadas precocemente, podem evoluir para cancro do colo do útero.

O vírus do papiloma humano é um vírus de ADN que pertence à família *Papillomaviridae*, sendo um dos vírus sexualmente mais transmissíveis. O HPV tem mais de 200 subtipos podendo ser dividido em grupos de alto e de baixo risco, estando os grupos de alto risco mais relacionados com infeções persistentes e o desenvolvimento de patologias.

Neste trabalho pretendeu-se estudar a presença e a influência do genótipo “null” do GSTT1 no desenvolvimento de lesão por HPV. A GSTT1 pertence a uma família de enzimas de fase II que atuam no metabolismo xenobiótico conjugando metabolitos com a glutatona tornando-os mais hidrossolúveis e conseqüentemente reduzindo o efeito citotóxico.

Foram utilizadas amostras de tecido da cérvix uterina de 45 mulheres, das quais se extraiu ADN genómico para posteriormente se identificar a estirpe de HPV através de PCR. A determinação do genótipo do GSTT1 foi realizada por Real-Time PCR. Das 45 amostras utilizadas, em 22 foi possível identificar o genótipo “null” do GSTT1. Na população em estudo, parece não existir relação entre o polimorfismo “null” do gene GSTT1 e o desenvolvimento de lesão por HPV.

Atualmente, na literatura existem ainda poucos estudos relacionados a este tema. Investigações futuras poderão vir a clarificar o papel do genótipo “null” do GSTT1 no desenvolvimento de lesão por HPV.

Palavras-chave

Cancro do colo do útero; HPV; GSTT1.

Abstract

Cervical cancer is one of the most common cancers among women. This neoplasm can develop from intraepithelial lesions that may originate from persistent high-risk HPV infections. These infections, if not detected and treated early, can progress to cervical cancer.

The human papilloma virus is a DNA virus that belongs to the *Papillomaviridae* family and is one of the most sexually transmitted viruses. HPV has more than 200 subtypes and can be divided into high and low risk groups, with high risk groups more related to persistent infections and the development of pathologies.

The aim of this work was to study the presence and influence of the GSTT1 “null” genotype on the development of HPV lesions. GSTT1 belongs to a family of phase II enzymes that act in xenobiotic metabolism by conjugating metabolites with glutathione, making them more water soluble and consequently reducing the cytotoxic effect.

Tissue samples from the uterine cervix of 45 women were used, from which genomic DNA was extracted in order to subsequently identify the HPV strain through PCR. The determination of GSTT1 genotype was performed by Real-Time PCR. Of the 45 samples used, in 22 it was possible to identify the “null” genotype of GSTT1. In the studied population, there seems to be no relationship between the “null” polymorphism of the GSTT1 gene and the development of lesions caused by HPV.

Currently, there are still few studies related to this topic in the literature. Future investigations may clarify the role of the GSTT1 “null” genotype in the development of HPV lesions.

Keywords

Cervical cancer; HPV; GSTT1.

Índice

Dedicatória	v
Agradecimentos	vii
Resumo	x
Abstract.....	xii
Índice	xiv
Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xix
Lista de Acrónimos	xxi
1. Introdução	1
1.1. HPV.....	1
1.1.1. O que é o HPV?.....	1
1.1.2. Que tipos de HPV existem?	2
1.1.3. Mecanismos de ação do HPV	2
1.1.4. Relação entre o cancro do colo do útero e a infeção por HPV.....	4
1.1.5. Cancro do colo do útero.....	5
1.1.6. Fatores de risco no desenvolvimento de HPV e cancro do colo do útero	6
1.1.7. Prevalência do HPV em Portugal e no mundo	7
1.1.8. Prevenção da infeção por HPV	8
1.2. GSTT1	9
1.2.1. Glutathione-S-transferase	9
1.2.2. Função do gene GSTT1	10
1.2.3. Polimorfismo “null” do GSTT1	11
1.2.4. Influência do gene GSTT1 na infeção por HPV	11
2. Objetivo	12
3. Materiais e Métodos	13
3.1. População em estudo.....	13
3.2. Procedimentos Laboratoriais	14
3.2.1. Extração de ADN de lâminas parafinadas.....	14
3.2.2. Determinação da estirpe de HPV	15
3.2.3. Genotipagem do gene GSTT1	16
3.2.4. Análise estatística	17

4. Resultados	18
5. Discussão dos resultados.....	22
6. Conclusão e perspectivas futuras	24
7. Referências Bibliográficas	25

Lista de Figuras

Figura 1 Representação esquemática do colo do útero, com e sem infecção.....	3
Figura 2 Representação da infecção por HPV (Adaptado de [15]).	4
Figura 3 Principais cancros por país, número estimado de novos casos em 2020, em mulheres de todas as idades. A cor laranja representa o cancro do colo do útero. (Adaptado de [20]).	5
Figura 4 Estimativa do número de casos incidentes de cancro do colo do útero a nível mundial, em mulheres de todas as idades (Adaptado de [20]). A cor laranja representa o cancro do colo do útero.	6
Figura 5 Prevalência da infecção por HPV, em mulheres com citologia cervical normal (Adaptado de [25]).	7
Figura 6 Representação da localização do gene GSTT1.	10
Figura 7 Esquema de extração de ADN de lâminas parafinadas.....	14
Figura 8 Exemplo de resultados obtidos do Real-Time PCR para a amostra 2 (Genótipo GSTT1 “present”).	18
Figura 9 Exemplo de resultados obtidos do Real-Time PCR para a amostra 11 (Genótipo GSTT1 “null”)......	18

Lista de Tabelas

Tabela 1 Fatores de risco para o desenvolvimento de cancro do colo útero (Adaptado de [21]).	6
Tabela 2 Métodos de prevenção para a infeção por HPV de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (Adaptado de [26]).	8
Tabela 3 Primers do gene GSTT1 e da β -globina utilizados para a realização do Real-Time PCR.	16
Tabela 4 Identificação de HPV nas mulheres em estudo, por idade.....	19
Tabela 5 Distribuição dos genótipos do gene GSTT1 nas mulheres em estudo, por idade..	19
Tabela 6 Associação entre o HPV e os genótipos do gene GSTT1 nas mulheres em estudo.	20
Tabela 7 Relação entre a presença de uma estirpe de HPV e a frequência polimórfica do gene GSTT1 nas mulheres em estudo.....	20
Tabela 8 Relação entre a presença da estirpe HPV16 e a frequência polimórfica do gene GSTT1 nas mulheres em estudo.	21
Tabela 9 Relação entre a presença de duas estirpes de HPV e a frequência polimórfica da GSTT1 nas mulheres em estudo.	21

Lista de Acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CHUCB	Centro Hospital Universitário Cova da Beia
CICS	Centro de Investigação em Ciências da Saúde
GSH	Glutathiona
GST	Glutathiona-S-transferase
GSTM1	Glutathiona-S-transferase M1
GSTT1	Glutathiona-S-transferase Teta 1
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HSIL	Lesões intraepiteliais escamosas de alto grau
LSIL	Lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
UBI	Universidade da Beira Interior

1. Introdução

1.1. HPV

1.1.1. O que é o HPV?

O vírus do papiloma humano (HPV) é um vírus de ADN pertencente à família *Papillomaviridae* (1). O genoma deste vírus envolve ADN circular de fita dupla com aproximadamente 8000 pares de base (2,3,4). De acordo com a Comissão de Nomenclatura dos Vírus do Papiloma Humano, cada tipo de HPV pode ser diferenciado em linhagens filogenéticas de acordo com a distribuição geográfica, patogenicidade, regulação da transcrição e resposta imunológica (5).

O HPV é um vírus epiteliotrópico por ter afinidade para infetar peles e mucosas (3) e é transmitido principalmente por via sexual, sendo conhecido como a infeção sexualmente transmissível mais conhecida em todo o mundo (6). O HPV propaga-se maioritariamente através do contacto direto pele a pele ou pele a mucosa. A atividade sexual com um indivíduo que tenha uma infeção ativa pelo HPV é o modo mais comum de transmissão. Existe também uma transmissão horizontal não sexual do HPV através do contacto com a pele, boca ou objetos, que são mais invulgares (7).

Este vírus é responsável por desencadear um grande número de infeções, e por muitas vezes não apresentar sintomas (6), podendo ser eliminado do organismo num prazo de 12 a 24 meses (4). Existem cerca de 200 subtipos de HPV podendo ser classificados em alto ou baixo risco, dependendo do seu grau de infeção e da sua patogenicidade (6).

Ambos os sexos, masculino e feminino, podem ser infetados, no entanto, a fração associada ao cancro pelo HPV em homens é muito menor do que nas mulheres, devido à vulnerabilidade do colo do útero à carcinogénese pelo HPV (8).

A investigação sobre o HPV tem sido desenvolvida e estimulada pela gravidade das patologias associadas à infeção por este vírus. Alguns tipos de HPV afetam o epitélio cutâneo formando apenas verrugas que podem ser benignas, outros afetam as mucosas podendo originar verrugas genitais, mas o foco principal são os HPV de alto risco que podem estar associados ao desenvolvimento de cancro (3).

1.1.2. Que tipos de HPV existem?

Existem vários subtipos de HPV. Os HPV de alto risco são os que estão maioritariamente envolvidos em infeções mais graves que podem evoluir para cancro e foram identificados em grande parte dos casos de cancro do colo do útero (6). Atualmente existem 15 subtipos que estão classificados como sendo HPV de elevado risco: HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 (3). O HPV16 está associado à maioria das neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), sendo considerado um precursor do cancro do colo do útero (9). A neoplasia intraepitelial cervical pode evoluir para carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo se não for tratada precocemente ou se o HPV for capaz de desativar as funções celulares do hospedeiro (10). O HPV16 tem um potencial oncogénico associado a infeções persistentes, apresenta uma alta carga viral e variantes com diferentes capacidades carcinogénicas (6). O HPV 18 apresenta também um elevado risco oncogénico. Estes dois génotipos de HPV são os que estão relacionados com a maioria dos casos de cancro cervical (9).

As estirpes de baixo risco, HPV tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 81, são principalmente associados a verrugas genitais e lesões cervicais benignas, podendo ser eliminadas com o tratamento adequado (1).

1.1.3. Mecanismos de ação do HPV

O HPV infeta células metaplásicas na zona de transformação cervical, incorporando-se no genoma do hospedeiro, levando à sobreexpressão de oncoproteínas virais que podem inativar genes supressores de tumor, inibir proteínas celulares e desregular processos biológicos, como proliferação celular, ciclo celular, apoptose e aumento de mutações (10,11). A progressão de células epiteliais infetadas por HPV para cancro é um processo de longo prazo associado à acumulação de alterações no ADN em genes nas células do hospedeiro (11).

No colo do útero, a zona de transição epitelial, designada de junção escamo-colunar, é mais susceptível à carcinogénese por estirpes de HPV de alto risco. Estas estirpes são mais propensas a ativar a proliferação celular na camada basal, promovendo o desenvolvimento de uma infeção persistente (4).



Figura 1 Representação esquemática do colo do útero, com e sem infecção.

Uma infecção persistente é definida como a presença de uma estirpe de HPV de alto risco por mais de dois anos (12). Para que ocorra uma infecção deste calibre, o HPV precisa infectar as células basais que apresentam características semelhantes às das células estaminais (4).

Apesar da fisiopatologia do HPV ainda não ser bem compreendida, acredita-se que este vírus entra nas células escamosas basais através de microfissuras que comprometem a barreira epitelial (4) e a partir daí tem de ter a capacidade para se integrar nas células do hospedeiro para iniciar a lesão (7). Inicialmente, o HPV replica-se juntamente com as células basais do hospedeiro, mantendo o número de cópias de ADN viral reduzido. À medida que as células basais, começam a avançar para a camada superior do epitélio, o ADN do HPV começa a replicar-se rapidamente, atingindo milhares de cópias por célula (13). Todo o ciclo viral do HPV tem um período de cerca de três semanas (13).

Para que o vírus continue a replicar-se necessita escapar ao sistema imunológico do hospedeiro. Em geral, após uma infecção, as células do hospedeiro ativam respostas imunológicas inatas e adaptativas que são controladas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC), de modo a combater a infecção pelo HPV. No entanto, este vírus parece conseguir escapar a estes mecanismos (10,14).

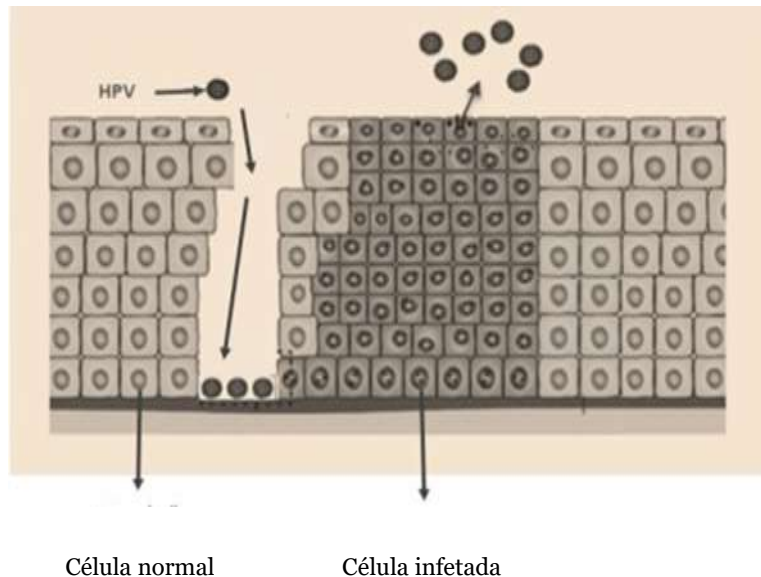


Figura 2 Representação da infecção por HPV (Adaptado de [15]).

1.1.4. Relação entre o cancro do colo do útero e a infecção por HPV

O cancro do colo do útero é uma neoplasia complexa causada por uma combinação de fatores genéticos e influência ambiental externa (16). Os vírus que estão associados ao cancro partilham alguns mecanismos oncogénicos que podem desregular os processos celulares (6).

A carcinogénese do colo do útero pode ser definida como um mecanismo complexo de divisão celular descontrolada que pode envolver a integração do gene do HPV juntamente com outras alterações celulares e factores epigenéticos (1,14). O cancro do colo útero é precedido por lesões precursoras tais como lesões intraepiteliais. Estas lesões podem ser desenvolvidas a partir de HPV de alto risco e caso não sejam detetadas e tratadas precocemente podem evoluir para cancro (4,7,17). O HPV foi identificado em várias lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) e em mais de 90% das lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL) e cancro cervical (17).

Apesar da infecção por HPV ser um dos principais fatores de risco no processo da carcinogénese do cancro do colo do útero, nem todas as infeções deste vírus evoluem para cancro (18). Cerca de 90% das alterações celulares induzidas pelo HPV no colo do útero regridem espontaneamente e o HPV é eliminado do organismo, sem quaisquer consequências oncogénicas (7). No entanto, há evidências que as infeções persistentes por HPV aumentam o risco de cancro cervical (4).

1.1.5. Cancro do colo do útero

O cancro do colo do útero é uma das neoplasias mais comuns (2) e uma das principais causas de morte relacionadas com o cancro na comunidade feminina (3). A distribuição deste cancro é diferente em tudo o mundo, com mais de 85% de mortes nos países menos desenvolvidos (19).

Estudos realizados pelo Reino Unido relataram que no ano de 2020 registou-se cerca de 600000 novos casos de cancro do colo do útero e cerca de 300000 mortes a nível mundial, com mais incidência em países menos desenvolvidos (7,10).

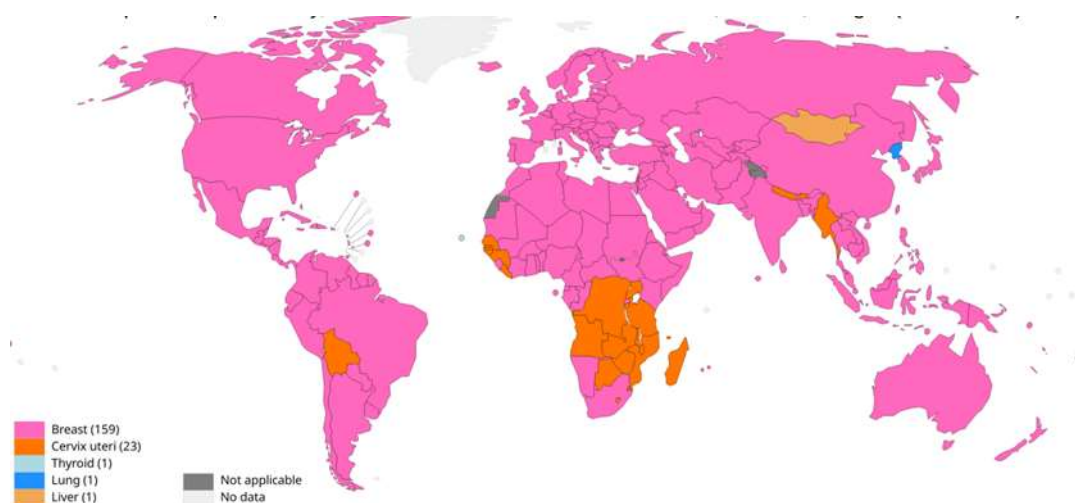


Figura 3 Principais cancros por país, número estimado de novos casos em 2020, em mulheres de todas as idades. A cor laranja representa o cancro do colo do útero. (Adaptado de [20]).

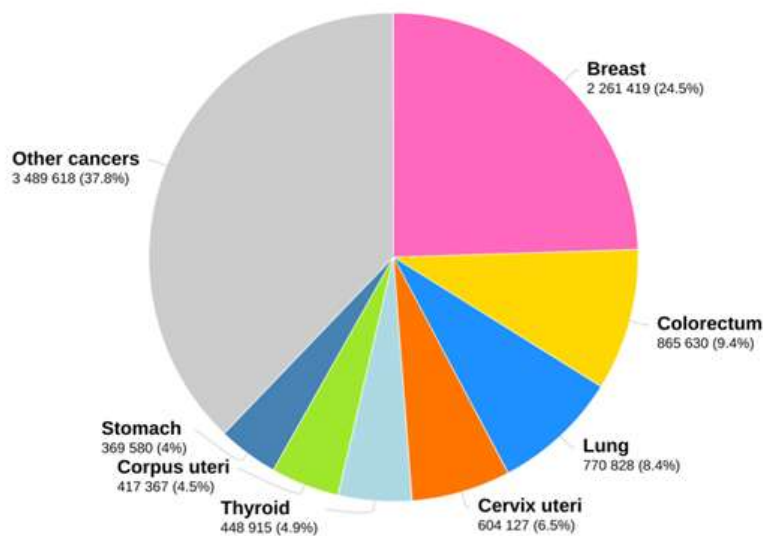


Figura 4 Estimativa do número de casos incidentes de cancro do colo do útero a nível mundial, em mulheres de todas as idades (Adaptado de [20]). A cor laranja representa o cancro do colo do útero.

1.1.6. Fatores de risco no desenvolvimento de HPV e cancro do colo do útero

Existem alguns fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento do cancro do colo útero, tais como: fatores comportamentais que envolvem a atividade sexual e o estilo de vida, e infeções persistentes que podem evoluir para tumores (21,22), apesar da persistência não ser medida de forma homogénea, é um conceito muito relevante, uma vez que em muitas populações submetidas a rastreio utilizando testes de HPV, baseiam-se em medidas de infecção persistente (4).

Tabela 1 Fatores de risco para o desenvolvimento de cancro do colo útero (Adaptado de [21]).

Fatores de risco
Coitarca
Vários parceiros sexuais
Tabagismo
Utilização de contraceptivos
Desenvolvimento anormal do colo do útero

1.1.7. Prevalência do HPV em Portugal e no mundo

Em geral, a distribuição epidemiológica da infecção pelo HPV varia significativamente em todo o mundo. A taxa de incidência da infecção pelo vírus está associada a fatores geográficos, socioeconómicos, culturais e genéticos relacionados à variabilidade do genoma viral, bem como fatores individuais, como idade, género e estado de saúde (23).

Um estudo realizado em Portugal determinou que cerca de vinte por cento da população feminina desenvolveu infecção por HPV, uma percentagem maior do que em países vizinhos (24). Mundialmente, a prevalência de HPV de alto risco em mulheres com citologia normal depende da região geográfica em que se situa. Em países desenvolvidos, a percentagem de mulheres com infecção por HPV é menor do que em países em desenvolvimento, isto devido às condições e aos meios que cada região tem para controlar e tratar mulheres infetadas (17).

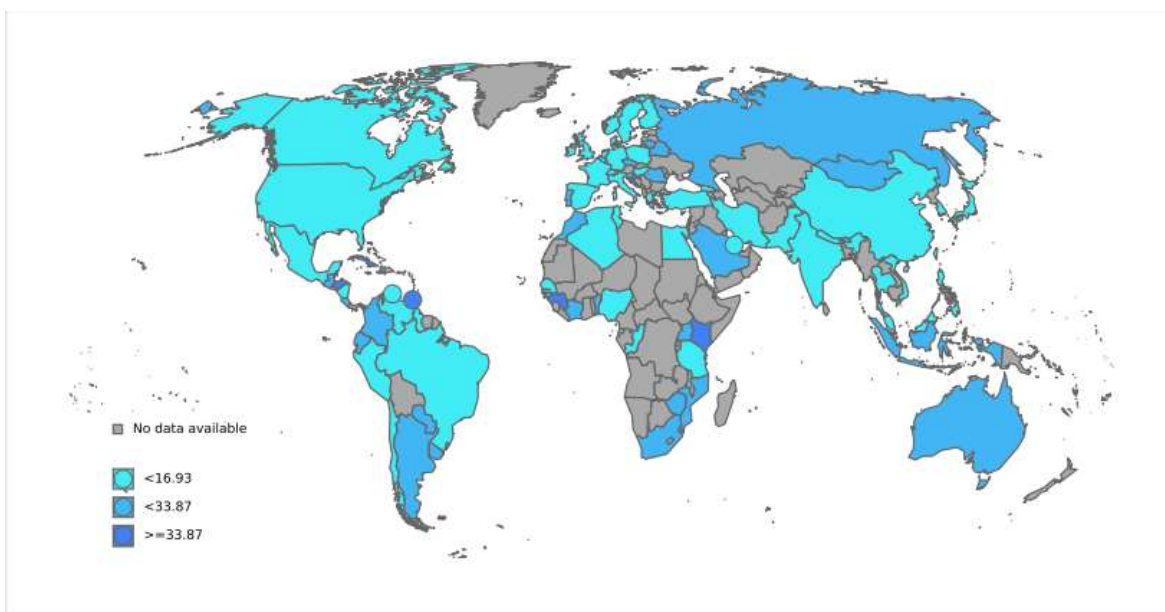


Figura 5 Prevalência da infecção por HPV, em mulheres com citologia cervical normal (Adaptado de [25]).

1.1.8. Prevenção da infeção por HPV

Como dito anteriormente, uma lesão por HPV persistente pode levar ao desenvolvimento de cancro do colo do útero. Para evitar o desenvolvimento de neoplasias é necessário que existam alguns métodos de prevenção (24,26).

A introdução da citologia cervical como método de triagem em meados do século 20 contribuiu para a diminuição de casos de cancro do colo do útero, mas a sua baixa sensibilidade exige uma repetição frequente, como tal existe a necessidade do desenvolvimento de métodos mais eficazes (27). Os conhecimentos atuais, conduziram à aplicação de novas estratégias de prevenção que incluem a testagem do HPV e a vacinação profilática (27). As vacinas contra o HPV devem ser administradas antes ou logo após o início da atividade sexual. O processo de vacinação mostrou ser eficaz na prevenção contra infeções persistentes (24,26). Atualmente existem três tipos de vacinas que são comercializadas, variando no número de genótipos de HPV contido. Todas as vacinas protegem contra as estirpes HPV16 e 18. A vacina nonavalente é administrada em Portugal desde o ano de 2017 e abrange nove subtipos de HPV: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58, prevendo 90% de eficácia na redução da incidência de cancros associados à infeção por HPV (28).

Apesar de apresentarem menor sensibilidade, os exames de rastreio tais como a citologia convencional têm sido uma técnica de grande sucesso dado que, antes do aparecimento do cancro do colo do útero existe uma fase pré-invasiva que se for detetada a tempo, pode ser tratada (17,26).

No entanto, se a citologia for acompanhada por teste de HPV, o rastreio oferece uma capacidade de prevenção 60-70% maior quando comparada à citologia convencional (39).

Tabela 2 Métodos de prevenção para a infeção por HPV de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (Adaptado de [26]).

Idade	
<21	Rastreio não é obrigatório
21-30	Citologia convencional (a cada 3 anos)
30-65	Teste conjunto (HPV + Papanicolau) de 5 em 5 anos
>65	Rastreio não é obrigatório

1.2. GSTT1

1.2.1. Glutathione-S-transferase

As glutathione-S-transferases (GSTs) são uma família de enzimas ubíquas, diméricas e multifuncionais de fase II que atuam no metabolismo xenobiótico conjugando metabolitos com a glutathione, tornando-os mais hidrossolúveis e conseqüentemente reduzindo o efeito citotóxico (29), convertendo as substâncias tóxicas do organismo de forma a poderem ser libertadas pela urina, de modo a completar o processo de detoxificação (18). Os compostos exógenos e endógenos com grupos funcionais eletrofílicos são degradados pela conjugação com a glutathione, capaz de neutralizar os seus locais eletrofílicos, aumentando a sua solubilidade e a facilidade na excreção (30).

A glutathione (GSH) é um tiol existente nas células eucarióticas na forma reduzida e oxidada (31). A forma reduzida da GSH é a mais encontrada no organismo estando inserida no processo de excreção dos xenobióticos pela interação entre o grupo tiol e o resíduo N-terminal das GSTs (31).

O modo de ação das GSTs envolve simultaneamente a atividade enzimática e a detoxificação (32). Na espécie humana, as GSTs podem ser classificadas em três grandes famílias: citosólicas ou solúveis, mitocondriais e microsómicas (30). As GSTs citosólicas podem ser divididas em sete classes de acordo com as suas propriedades físicas, químicas e estruturais: Alpha, Mu, Omega, Pi, Sigma, Theta e Zeta (29). Em geral, as GSTs citosólicas são proteínas que formam homodímeros ou heterodímeros em que ambas as subunidades devem derivar da mesma classe devido à sua compatibilidade. O tipo e a posição dos aminoácidos no centro activo das GST desempenham um papel importante na afinidade de ligação ao substrato e na sua função catalítica (33). As GSTs têm dois centros ativos conhecidos como “G-site” e “H-site”. O centro ativo denominado de “G-site” é o mais conservado das isoformas e contém o local de ligação para a glutathione. O “H-site” é altamente variável em termos de forma e composição química entre classes (15).

As GSTs operam de forma a diminuir os danos do stress oxidativo, modulando a acção de outras enzimas e proteínas importantes para a manutenção da integridade genómica (29).

1.2.2. Função do gene GSTT1

O gene GSTT1 está localizado no cromossoma 22q11.23 (6) e é mais conhecido por participar na destoxificação de substâncias mais pequenas, como hidrocarbonetos reativos, por exemplo metabolitos ativos das aminas heterocíclicas formadas pela cozedura da carne a grandes temperaturas (30). É também capaz de combinar compostos electroquímicos como drogas, toxinas ambientais, produtos da cadeia de oxidação com a glutathiona, de modo a que entrem na etapa metabólica seguinte, permitindo que as substâncias tóxicas sejam facilmente excretadas do organismo (34).

A importância que as GSTs têm na eliminação de compostos tóxicos e no combate ao stress oxidativo, fundamenta que se testem possíveis relações com o risco de várias lesões (35).

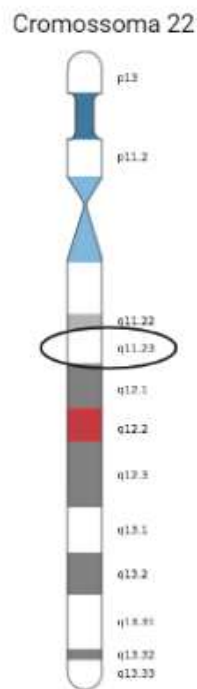


Figura 6 Representação da localização do gene GSTT1.

1.2.3. Polimorfismo “null” do GSTT1

O gene GST possui polimorfismos em múltiplos loci. A mutação mais comum dos genes GSTT1 e GSTM1 é o genótipo “null”, em que a mutação do gene irá comprometer a ativação ou inativação da enzima correspondente (34). O gene GSTT1 pode apresentar um polimorfismo de deleção completa de todo o gene, ou seja, a presença do alelo mutado em homozigotia leva à ausência total de função enzimática (6). Tal processo vai mudar a capacidade de destoxificação de substâncias tóxicas, cancerígenas, expondo as células a estas substâncias malignas, causando danos no ADN, stress oxidativo, e aumentando a probabilidade de ocorrerem mutações, o que pode provocar o desenvolvimento de uma patologia (18).

O genótipo “null” do GSTT1 tem uma frequência estimada de 20 e 61% na população caucasiana e asiática, respetivamente (13).

1.2.4. Influência do gene GSTT1 na infeção por HPV

As espécies reativas de oxigénio (ROS) são importantes segundos mensageiros capazes de regular os processos intracelulares (35). Num indivíduo saudável, existe um balanço entre ROS e antioxidantes, no entanto quando este balanço é alterado, o número de ROS aumenta e ocorre o processo ao qual chamamos “stress oxidativo” que pode implicar consequências celulares (36). O processo inflamatório envolvido na infeção por HPV aumenta os níveis celulares de ROS (37), o que leva ao aumento do stress oxidativo que, juntamente com a infeção por HPV, pode levar ao desenvolvimento lesões intraepiteliais escamosas de alto grau e cancro do colo do útero (17,29). A deleção do gene GSTT1, ao levar à ausência de atividade desta enzima pode provocar falhas na destoxificação de xenobióticos, podendo levar ao acúmulo de espécies reativas de oxigénio, aumentando o stress oxidativo, fazendo com que a mulher infetada pelo HPV esteja mais susceptível a desenvolver reações celulares malignas (13).

Apesar de existir pouca informação na literatura, Bortolli et al. e Sudenga et al. referem que há genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos podem afetar a história natural dos subtipos de HPV, especialmente daqueles com alto risco oncogénico, os HPV de alto risco (6,38).

2. Objetivo

Com o presente trabalho pretendeu-se estudar a presença e a influência do genótipo “null” da GSTT1 no desenvolvimento de lesão por HPV. Para atingir este objectivo definiram-se como objectivos principais:

1. Extrair ADN de amostras de cérvix uterina conservadas por parafinização em blocos, em mulheres com lesões cervicais.
2. Identificar a presença e o tipo de HPV em cada amostra.
3. Identificar o genótipo do gene GSTT1 em cada amostra.
4. Estabelecer relação entre o genótipo do gene GSTT1 e a estirpe de HPV identificada em cada amostra.

3. Materiais e Métodos

3.1. População em estudo

Foram utilizadas amostras de tecido da cérvix uterina de 45 mulheres, conservadas em blocos de parafina. Foi extraído ADN das 45 amostras, em 44 foi possível identificar a estirpe de HPV e foi possível identificar o genótipo do polimorfismo “null/presente” do GSTT1 em 38 amostras. O trabalho decorreu no Centro de Investigação em Ciências da Saúde, CICS, na Universidade da Beira Interior e as amostras foram recolhidas na Consulta de Ginecologia do Centro Hospital Universitário Cova da Beia (CHUCB). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do CHCUB. O consentimento informado de todas as mulheres foi obtido previamente à concretização do estudo.

3.2. Procedimentos Laboratoriais

3.2.1. Extração de ADN de lâminas parafinadas

Para extrair o ADN do tecido de lâminas parafinadas, utilizou-se o kit *QIAamp DNA FFPE Tissue* da *QIAGEN*. Às lâminas parafinadas foi adicionado xileno para que a parafina fosse removida e posteriormente adicionou-se etanol. De seguida, todas as lâminas foram colocadas a secar a temperatura ambiente. Com o bisturi raspou-se a amostra de cada lâmina e colocaram-se em tubos *ependorf* devidamente identificados. Em cada tubo, foram adicionados 180 μL de Buffer ATL e 20 μL de Proteinase K, com o objetivo de lisar as células libertando o material genético. Agitaram-se todos os tubos seguindo-se uma incubação a 56°C durante 60 minutos e posteriormente a 90°C durante 60 minutos, de modo a reverter a ligação com a formalina. Após a incubação, as amostras foram deixadas a arrefecer à temperatura ambiente. De seguida, a cada amostra adicionou-se 200 μL de Buffer AL e 200 μL de etanol absoluto. Todo o lisado foi transferido para uma coluna e posteriormente submetido a uma centrifugação 8000rpm, 2 minutos; neste passo o ADN liga-se à membrana. A coluna foi colocada num novo tubo de colheita e foram adicionados 500 μL de Buffer AW1 sendo de novo submetida a centrifugação 8000rpm, 1 minuto. O conteúdo do tubo de colheita foi descartado. Foram adicionados 500 μL de Buffer AW2 à coluna, seguido de centrifugação 8000rpm, 1 minuto. A coluna foi colocada num novo tubo de colheita e centrifugou-se a 14000rpm durante 3 minutos até a membrana secar por completo. Por fim, a coluna foi colocada num tubo de eluição devidamente identificado e foram adicionados 50 μL de Buffer ATE no centro da coluna sem tocar na membrana, ficando a incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente. Para finalizar o processo, o tubo foi submetido a uma centrifugação 14000 rpm, 1 minuto de modo que a membrana ficasse completamente seca. No final da extracção, o ADN encontra-se no eluato.

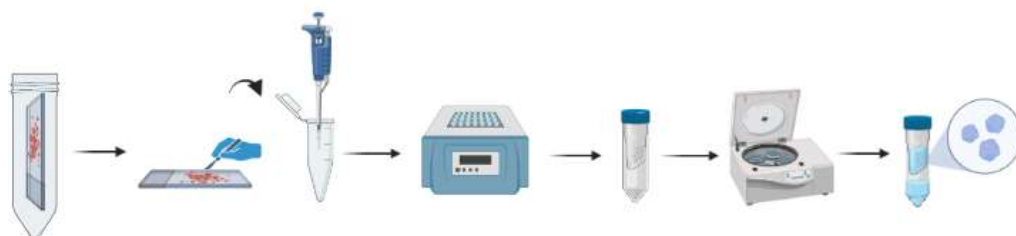


Figura 7 Esquema de extração de ADN de lâminas parafinadas.

3.2.2. Determinação da estirpe de HPV

A determinação da estirpe de HPV foi realizada pelo sistema de PCR *Anyplex™ II*. O kit de detecção *Anyplex™ II HPV HR (Anyplex_HR; Seegene, Seoul, Korea)* é um ensaio PCR multiplex em tempo real idealizado para detectar e distinguir particularmente 14 tipos de vírus do papiloma humano (HPV) de alto risco utilizando a tecnologia de clivagem e extensão de oligonucleótidos de marcação (TOCE) a partir de amostras de citologia líquida e de esfregaços cervicais (39). Este kit é capaz de detectar 14 tipos de HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68. O PCR foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.3. Genotipagem do gene GSTT1

A genotipagem do gene GSTT1 (“present” ou “null”) foi realizada por Real-time PCR e foi utilizado o gene *housekeeping* β -Globina como controlo positivo. Os conjuntos de primers para o GSTT1 e para a β -Globina foram (35):

Tabela 3 Primers do gene GSTT1 e da β -globina utilizados para a realização do Real-Time PCR.

Primers	Sequência	Referência Bibliográfica
GSTT1 forward	5'TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3'	33
GSTT1 reverse	5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'	33
β-Globina forward	5'-CAACTTCATCCACGTTACACC-3'	33
β-Globina reverse	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'	33

A mistura de cada reação de PCR tinha por base um volume total de 19 μ L, com 0,6 μ L de cada primer; 10 μ L de SYBR Green qPCR Master Mix, 7,8 μ L de água e 2 μ L de ADN genómico. O PCR multiplex foi realizado recorrendo ao equipamento *MyCycler Thermal Cycler da BioRad®*, tendo sido efetuada uma pré-incubação da mistura de reação a 95°C por 10 min. 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.

3.2.4. Análise estatística

Para avaliar a associação entre os genótipos e o desenvolvimento de lesão por HPV, foram feitas estimativas de risco relativo, utilizando a análise de regressão logística, cálculo de odds ratios (ORs) e intervalos de confiança de 95% (ICs). Os cálculos foram feitos com o software SPSS for Windows (versão 28.0). O teste de qui-quadrado foi aplicado para comparar as frequências alélicas entre controlos normais e doentes com HPV. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (40).

4. Resultados

A identificação dos genótipos do GSTT1 em Real-Time PCR foi feita com o programa *CFX Connect Real-Time PCR Detection System | Bio-Rad*. Em 38 amostras, foi possível identificar o genótipo do polimorfismo “null/presente” do GSTT1. Na figura 5 e 6 estão representados dois exemplos dos resultados obtidos do genótipo “present” e “null” do GSTT1, respetivamente.

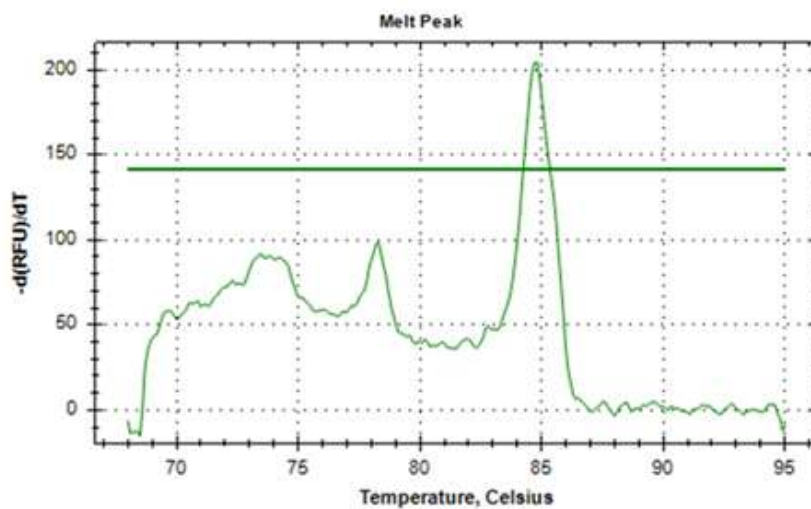


Figura 8 Exemplo de resultados obtidos do Real-Time PCR para a amostra 2 (Genótipo GSTT1 “present”).

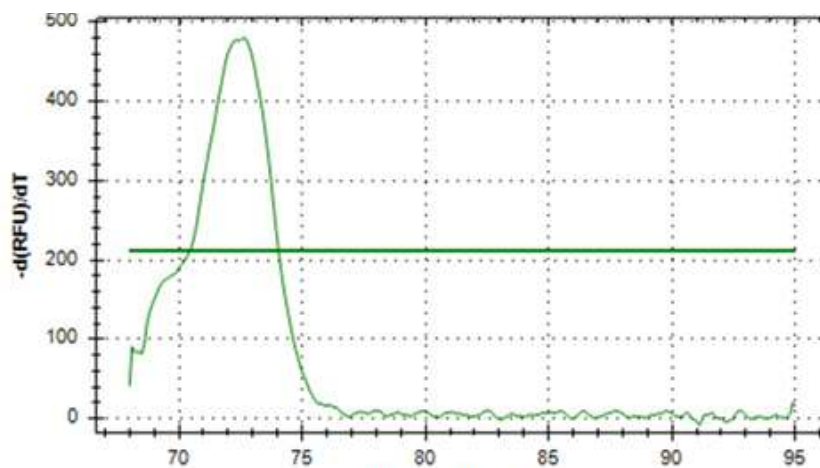


Figura 9 Exemplo de resultados obtidos do Real-Time PCR para a amostra 11 (Genótipo GSTT1 “null”).

No presente estudo, tivemos como objetivo analisar uma possível relação entre o genótipo “null” da GSTT1 e o desenvolvimento de lesão por HPV. Foram utilizadas amostras de tecido da cérvix uterina de 45 mulheres com idades compreendidas entre 24 e 82 anos, com média de 40,6 anos. Em 44 amostras foi possível identificar a estirpe de HPV e em 38 amostras foi possível determinar o genótipo do GSTT1.

Tabela 4 Identificação de HPV nas mulheres em estudo, por idade.

HPV	Idade		OR (IC 95%) *	p-value
	<50 n (%)	≥50 n(%)		
Ausente	4(10,5)	0	1	
Presente	28(73,7)	6(15,8)	0,875 (0,768- 0,997)	0,360

*OR, Odds ratio; IC, Intervalo de confiança

Na tabela 4 estão apresentados os resultados obtidos da presença ou ausência de HPV nas amostras de tecido de cérvix uterina analisadas. Verifica-se que, apenas 10,5% das amostras apresentam ausência de HPV e, face aos nossos resultados existe maior predominância deste vírus, no grupo etário abaixo dos 50 anos (OR 0,875; IC 0,768-0,997; P=0,360).

Tabela 5 Distribuição dos genótipos do gene GSTT1 nas mulheres em estudo, por idade.

Genótipo	Idade		OR (IC 95%) *	p-value
	<50 n (%)	≥50 n(%)		
GSTT1 “Present”	14 (36,8)	2 (5,3)	1	
GSTT1 “Null”	18 (47,4)	4 (10,5)	1,556[0,248– 9,750]	0,635

*OR, Odds ratio; IC, Intervalo de confiança

A distribuição dos genótipos do GSTT1 nas 38 amostras em que se obteve amplificação está apresentada na tabela 5. Em 22 amostras identificou-se o genótipo “null” do GSTT1. Um total de 47,4% das mulheres com idade inferior a 50 anos exibe genótipo “null” do GSTT1 (OR 1,556; IC 0,248-9,750; P=0,635).

Tabela 6 Associação entre o HPV e os genótipos do gene GSTT1 nas mulheres em estudo.

	HPV ausente (%)	HPV presente (%)	OR (IC 95%) *	P-value
GSTT1 “Present”	1 (2,6)	15 (39,5)	1	
GSTT1 “Null”	3 (7,9)	19 (50)	0,422[0,040-4,482]	0,464

*OR, Odds ratio; IC, Intervalo de confiança

Os resultados da associação entre a identificação de HPV e a frequência polimórfica do GSTT1, de modo a avaliar se existe uma relação entre o genótipo “null” do GSTT1 e a presença de HPV, são apresentados na tabela 6. O genótipo “null” do GSTT1 é mais frequente em indivíduos que apresentam lesão por HPV, pois cerca de 50% dos indivíduos detém HPV e ausência do gene GSTT1, no entanto cerca de 40% dos indivíduos é positivo para o HPV e apresenta genótipo “present” do GSTT1 (OR 0,422; IC 0,040-4,482; P=0,464).

Tabela 7 Relação entre a presença de uma estirpe de HPV e a frequência polimórfica do gene GSTT1 nas mulheres em estudo.

	HPV ausente (%)	HPV 1 estirpe (%)	OR (IC 95%) *	P-value
GSTT1 “Present”	1 (3,5)	12 (41,4)	1	
GSTT1 “null”	3 (10,3)	13 (44,8)	0,361[0,033-3,962]	0,390

*OR, Odds ratio; IC, Intervalo de confiança

A tabela 7 relaciona a presença de uma estirpe de HPV e a frequência polimórfica da GSTT1. Num total de 86,2% das mulheres (n=25), foi identificada uma estirpe de HPV e em 44,8% deste total apresenta um genótipo “null” do GSTT1 (OR 0,361; IC 0,033-3,962; P=0,390).

Tabela 8 Relação entre a presença da estirpe HPV16 e a frequência polimórfica do gene GSTT1 nas mulheres em estudo.

	HPV ausente (%)	HPV 16 (%)	OR (IC 95%) *	P-value
GSTT1 “Present”	1 (4,4)	7 (30,4)	1	
GSTT1 “Null”	3 (13)	12 (52,2)	0,571[0,049-6,606]	0,651

*OR, Odds ratio; IC, Intervalo de confiança

A tabela 8 apresenta o total de amostras em que a estirpe HPV16 está presente (n=19). Nesta análise pretende-se avaliar se existe uma relação entre o genótipo do GSTT1 e a estirpe de HPV identificada. Um total de 52,2% das mulheres apresenta genótipo “null” do GSTT1 e infecção pela estirpe HPV16 (OR 0,571; IC 0,049-6,606; P=0,651).

Tabela 9 Relação entre a presença de duas estirpes de HPV e a frequência polimórfica da GSTT1 nas mulheres em estudo.

	HPV ausente (%)	HPV duas estirpe (%)	OR (IC 95%) *	P-value
GSTT1 “Present”	1 (8,3)	3 (25)	1	
GSTT1 “Null”	3 (25)	5 (41,7)	0,556[0,038-8,085]	0,665

*OR, Odds ratio; IC, Intervalo de confiança

A tabela 9 apresenta a relação entre a presença de duas estirpes de HPV e o genótipo da GSTT1. Num total de 66,7% das mulheres (n=8), foram identificadas 2 estirpes de HPV, e 5 mulheres possuem genótipo “null” do GSTT1 (OR 0,556; IC 0,038-8,085; P=0,665).

5. Discussão dos resultados

O objetivo do presente estudo é analisar a presença do genótipo “null” do GSTT1 e a sua influência no desenvolvimento de lesão por HPV.

Como referido anteriormente, o gene GSTT1 pertence a uma família de enzimas de fase II, que estão envolvidas no processo de destoxificação de xenobióticos e a sua ausência pode levar ao desenvolvimento de patologias, devido à maior susceptibilidade dos efeitos nocivos do stress oxidativo e da menor capacidade de destoxificação de compostos tóxicos (13,29,41).

O vírus do papiloma humano possui uma grande variedade de estirpes, podendo ser de baixo ou alto risco (6). No nosso estudo foram identificadas estirpes de alto risco, tendo sido analisada a estirpe HPV16 isoladamente, por ser a estirpe com mais prevalência nas amostras utilizadas e por ser aquela que está associada à maioria das neoplasias intraepiteliais cervicais. Em estudos realizados por Ouedraogo et al., 2020 (13) analisou-se a frequência polimórfica dos genes GSTT1 e GSTM1 e a sua relação com a infeção por HPV e nesse estudo na população em geral da África Ocidental, não se obteve relações estatísticas significativas que comprovassem que o genótipo “null” das GSTs influencie a lesão por HPV.

Os resultados obtidos por Ouedraogo et al., 2020 (13) são semelhantes aos encontrados por um estudo anterior realizado por Agodi et al., 2010 (42) em Itália. Os resultados de ambos os estudos sugerem que a deleção dos genótipos GSTT1 não influencia a lesão por HPV (24,35). Os nossos resultados corroboram estas investigações, no entanto, há particularidades que podem existir de acordo com os diferentes tipos de HPV de alto risco.

Bortolli et al., 2021 (29) procuraram verificar, através de uma revisão se os polimorfismos da GSTT1 e GSTM1 estavam associados à infeção por HPV. Através dessa revisão os autores referem que a presença dos genótipos nulos do GSTM1 e GSTT1 comprometem a desintoxicação celular, uma vez que diminuem a metabolização de substâncias tóxicas, favorecendo a carcinogénese. Bortolli et al., 2021 (29) na sua análise afirmam que a frequência polimórfica de diferentes classes de GSTs podem causar efeitos diferentes quando associados a vírus e a outros genes e a percepção desta relação pode auxiliar a compreensão da evolução patológica da doença (29).

Por outro lado, na revisão realizada por Bortolli et al., 2021 (29) é referido que o genótipo “null” do GSTT1 além de ser pouco frequente pode até ser um método de proteção na população, pois os alelos nulos podem alterar a carcinogénese em mulheres que apresentam lesão por HPV. Para corroborar esta afirmação, num estudo posterior na população brasileira, Bortolli et al., 2022 (6) obtiveram pela primeira vez resultados em que verificam que o genótipo “null” do GSTT1 é um fator de proteção contra a infeção viral, isto é, mulheres com este genótipo são menos propensas a desenvolver infeção por HPV (6).

Na análise dos resultados obtidos na nossa pesquisa, verificou-se que, a maioria das lesões que apresentam infeção por estirpes de alto risco de HPV apresenta genótipo “null” do GSTT1 (50%), no entanto, os dados divergem dos resultados de outros grupos de investigação, pois na população em estudo o genótipo “null” do GSTT1 não influencia a lesão por HPV. Os nossos resultados têm como fator limitante o baixo número de casos em análise, mas este é o primeiro estudo, do nosso conhecimento, que avalia a relação entre os genótipos do GSTT1 e o desenvolvimento de lesões por HPV na população portuguesa. Na literatura existem ainda poucos estudos que corroborem ou contrariem os nossos resultados. Estudos futuros poderão vir a esclarecer a relação entre os genótipos do GSTT1 e a sua influência no desenvolvimento de lesões por HPV.

6. Conclusão e perspectivas futuras

O vírus do papiloma humano pode levar ao aumento do stress oxidativo e posterior desenvolvimento de cancro do colo do útero. A GSTT1 é uma enzima de fase II responsável pelo combate ao stress oxidativo, mas cuja presença do genótipo “null” implica a total deleção de GSTT1. Assim, no presente estudo, pretendeu-se fazer uma análise do genótipo do gene GSTT1 e verificar a sua influência no desenvolvimento de lesão por HPV. Utilizou-se amostras do tecido da cérvix uterina de 45 mulheres. Em 44 mulheres foi possível identificar a estirpe de HPV e em 38 identificou-se o polimorfismo do gene GSTT1.

Verificou-se que a maioria das lesões que apresentavam infeção por pelo menos uma estirpe de HPV, essas mulheres eram concomitantemente portadoras do genótipo “null” do GSTT1. Apesar do poder estatístico, devido ao baixo número de amostras, é possível que o genótipo “null” comprometa a destoxificação. É por isso pertinente continuar a presente investigação, o aumento da amostra poderá reforçar estatisticamente a relação entre o genótipo “null” do GSTT1 e a infeção por HPV. Também um seguimento das doentes, para avaliar a presença ou ausência de doença a longo prazo e correlação com o genótipo de GSTT1 e estirpes de alto risco de HPV será um passo importante para melhor compreender a eventual relação GSTT1/HPV.

Apesar de já existirem alguns estudos que abordam este tema, não existe literatura robusta que estabeleça uma ligação do genótipo “null” do GSTT1 e a influência no desenvolvimento de lesão por HPV. Este estudo é o primeiro, do nosso conhecimento, que avalia a relação dos polimorfismos do gene GSTT1 e o desenvolvimento de lesão por HPV em mulheres portuguesas e por isso é pertinente continuar esta investigação para verificar se o genótipo “null” do GSTT1 é ou não um fator de risco no desenvolvimento de lesão e cancro do colo do útero, quando na presença de estirpes de alto risco de HPV.

7. Referências Bibliográficas

- 1- Gupta SM, Mania-Pramanik J. Molecular mechanisms in progression of HPV-associated cervical carcinogenesis. *J Biomed Sci.* 2019 Apr 23;26(1):28. doi: 10.1186/s12929-019-0520-2. Retraction in: *J Biomed Sci.* 2019 Jul 04;26(1):50. PMID: 31014351; PMCID: PMC6477741.
- 2- Rahangdale L, Mungo C, O'Connor S, Chibwasha C J, Brewer N T. Human papillomavirus vaccination and cervical cancer risk *BMJ* 2022; 379 :e070115 doi:10.1136/bmj-2022-070115
- 3- Scarth JA, Patterson MR, Morgan EL, Macdonald A. The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. *J Gen Virol.* 2021 Mar;102(3):001540. doi: 10.1099/jgv.0.001540. Epub 2021 Jan 11. PMID: 33427604; PMCID: PMC8148304.
- 4- de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018;47:2-13. doi:10.1016/j.bpobgyn.2017.08.015
- 5- Chan CK, Aimagambetova G, Ukybassova T, Kongrtay K, Azizan A. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination - Review of Current Perspectives. *J Oncol.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/3257939
- 6- Bortolli APR, Vieira VK, Treco IC, Pascotto CR, Wendt GW, Lucio LC. GSTT1 and GSTM1 polymorphisms with human papillomavirus infection in women from southern Brazil: a case-control study. *Mol Biol Rep.* 2022 Jul;49(7):6467-6474. doi: 10.1007/s11033-022-07475-1. Epub 2022 May 4. PMID: 35507115; PMCID: PMC9065665.
- 7- Choi, S.; Ismail, A.; Pappas-Gogos, G.; Boussios, S. HPV and Cervical Cancer: A Review of Epidemiology and Screening Uptake in the UK. *Pathogens* 2023, 12, 298. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020298>
- 8- Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Prim.* 2016;2. doi:10.1038/nrdp.2016.86
- 9- Wuerthner, Barbara A. NP-C; Avila-Wallace, Maria RNC, WHNP. Cervical cancer: Screening, management, and prevention. *The Nurse Practitioner* 41(9):p 18-23, September 22, 2016. | DOI: 10.1097/01.NPR.0000490390.43604.5f
- 10- Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key molecular events in cervical cancer development. *Med.* 2019;55(7). doi:10.3390/medicina55070384

- 11- Ye J, Mu YY, Wang J, He XF. Individual effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on cervical or ovarian cancer risk: An updated meta-analysis. *Front Genet.* 2023 Jan 12;13:1074570. doi: 10.3389/fgene.2022.1074570. PMID: 36712849; PMCID: PMC9879013.
- 12- Goodman A. HPV testing as a screen for cervical cancer. *BMJ.* 2015 Jun 30;350:h2372. doi: 10.1136/bmj.h2372. PMID: 26126623.
- 13- Ouedraogo TC, Djigma FW, Idani B, et al. Impact of glutathione S-transferase genes polymorphisms on human papillomavirus infection and precancerous lesions in West African women. 2020;12(December):59-70. doi:10.5897/IJGMB2020.0197
- 14- Chan CK, Aimagambetova G, Ukybassova T, Kongrtay K, Azizan A. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination - Review of Current Perspectives. *J Oncol.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/3257939
- 15- Singh RR, Reindl KM. Glutathione S-Transferases in Cancer. Published online 2021.
- 16- Hu Z, Ma D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. *Cancer Med.* 2018 Oct;7(10):5217-5236. doi: 10.1002/cam4.1501. Epub 2018 Sep 14. PMID: 30589505; PMCID: PMC6198240.
- 17- Piña-Sánchez P. Human Papillomavirus: Challenges and Opportunities for the Control of Cervical Cancer. *Arch Med Res.* 2022;53(8):753-769. doi:10.1016/j.arcmed.2022.11.009
- 18- Ye J, Mu YY, Wang J, He XF. Individual effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on cervical or ovarian cancer risk: An updated meta-analysis. *Front Genet.* 2023 Jan 12;13:1074570. doi: 10.3389/fgene.2022.1074570. PMID: 36712849; PMCID: PMC9879013.
- 19- Zhang X, Zeng Q, Cai W, Ruan W. Trends of cervical cancer at global, regional, and national level: data from the Global Burden of Disease study 2019. *BMC Public Health.* 2021 May 12;21(1):894. doi: 10.1186/s12889-021-10907-5. PMID: 33975583; PMCID: PMC8114503.

- 20- Top cancer per country (incidence) IARC, WHO [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmssc=0&include_nmssc_other=0&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&show_ranking=0&rotate=%255B10%252C0%255D] (consultado dia 17 de maio de 2023).
- 21- Johnson CA, James D, Marzan A, Armaos M. Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management. *Semin Oncol Nurs.* 2019;35(2):166-174. doi:10.1016/j.soncn.2019.02.003
- 22- Ntanasis-Stathopoulos I, Kyriazoglou A, Lontos M, Dimopoulos MA, Gavriatopoulou M. Current trends in the management and prevention of human papillomavirus (HPV) infection. *J BUON.* 2020;25(3):1281-1285.
- 23- Kombe Kombe AJ, Li B, Zahid A, Mengist HM, Bounda GA, Zhou Y, Jin T. Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation. *Front Public Health.* 2021 Jan 20;8:552028. doi: 10.3389/fpubh.2020.552028. PMID: 33553082; PMCID: PMC7855977.
- 24- Félix A, Alemany L, Tous S, de Sanjosé S, Bosch FX. HPV distribution in cervical cancer in Portugal. A retrospective study from 1928 to 2005. *Papillomavirus Res.* 2016;2:41-45. doi:10.1016/j.pvr.2016.02.003
- 25- ICO. Human Papillomavirus and Related Diseases Report. 2016;(October). www.hpvcentre.com
- 26- Nailescu C, Ermel AC, Shew ML. Human papillomavirus-related cancer risk for solid organ transplant recipients during adult life and early prevention strategies during childhood and adolescence. *Pediatr Transplant.* 2022;26(7):1-7. doi:10.1111/petr.14341
- 27- Pista A, Costa C, Saldanha C, Moutinho JAF, Moutinho JM, Arrobas F, Catalão C, Kempers J. Budget impact analysis of cervical cancer screening in Portugal: comparison of cytology and primary HPV screening strategies. *BMC Public Health.* 2019 Feb 26;19(1):235. doi: 10.1186/s12889-019-6536-4. PMID: 30808324; PMCID: PMC6391842.
- 28- Medeiros R, Vaz S, Rebelo T, Figueiredo-Dias M. Prevention of human papillomavirus infection. Beyond cervical cancer: A brief review. *Acta Med Port.* 2020;33(3):198-201. doi:10.20344/amp.12259
- 29- Bortolli APR, Vieira VK, Stefanski EE, Lazarotto AK, Lucio LC. Relationship between GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and HPV infection: a systematic review. *Mol Biol Rep.* 2021;48(9):6631-6636. doi:10.1007/s11033-021-06515-6

- 30- Ramalhinho AC, Fonseca-Moutinho JA, Breitenfeld L. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 genotypes and breast cancer risk: A study in a Portuguese population. *Mol Cell Biochem.* 2011;355(1-2):265-271. doi:10.1007/s11010-011-0863-9
- 31- Pacholak, L.M., Kern, R., de Oliveira, S.T. et al. Effects of GSTT1 and GSTM1 polymorphisms in glutathione levels and breast cancer development in Brazilian patients. *Mol Biol Rep* 48, 33–40 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06107-w>
- 32- Sharma A, Gupta S, Sodhani P, et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 Polymorphisms, cigarette smoking and HPV infection in precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2015;16(15):6429-6438. doi:10.7314/APJCP.2015.16.15.6429
- 33- Koirala B K S, Moural T, Zhu F. Functional and Structural Diversity of Insect Glutathione S-transferases in Xenobiotic Adaptation. *Int J Biol Sci.* 2022 Sep 11;18(15):5713-5723. doi: 10.7150/ijbs.77141. PMID: 36263171; PMCID: PMC9576527.
- 34- Ye J, Mu YY, Wang J, He XF. Individual effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on cervical or ovarian cancer risk: An updated meta-analysis. *Front Genet.* 2023;13(January):1-22. doi:10.3389/fgene.2022.1074570
- 35- Casteleiro Alves MM, Almeida M, Oliani AH, Breitenfeld L, Ramalhinho AC. CYP19A1 TC/CC Polymorphism, along with Deletion of GSTM1 and GSTT1 Genes, Strongly Influences Female Infertility Risk. *Antioxidants (Basel).* 2023 Apr 16;12(4):940. doi: 10.3390/antiox12040940. PMID: 37107315; PMCID: PMC10135531.
- 36- Alves MMC, Almeida M, Oliani AH, Breitenfeld L, Ramalhinho AC. Women with polycystic ovary syndrome and other causes of infertility have a higher prevalence of GSTT1 deletion. *Reprod Biomed Online.* 2020 Nov;41(5):892-901. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.06.010. Epub 2020 Jun 24. PMID: 32855063.
- 37- Cruz-Gregorio A, Manzo-Merino J, Lizano M. Cellular redox, cancer and human papillomavirus. *Virus Res.* 2018;246:35-45. doi:10.1016/j.virusres.2018.01.003
- 38- Sudenga SL, Shrestha S, Macaluso M, Partridge EE, Johanning GL, Piyathilake CJ. Functional variants in CYP1A1 and GSTM1 are associated with clearance of cervical HPV infection. *Gynecol Oncol.* 2014;135(3):560-564. doi:10.1016/j.ygyno.2014.09.015
- 39- Jung S, Lee B, Lee KN, Kim Y, Oh EJ. Clinical validation of Anyplex II HPV HR detection test for cervical cancer screening in Korea. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140(3):276-280. doi:10.5858/arpa.2015-0117-AO
- 40- Ramalhinho ACM, Fonseca-Moutinho JA, Breitenfeld Granadeiro LATG. Positive association of polymorphisms in estrogen biosynthesis gene, CYP19A1, and metabolism, GST, in breast cancer susceptibility. *DNA Cell Biol.* 2012;31(6):1100-1106. doi:10.1089/dna.2011.1538

- 41- Ouedraogo, T. , Djigma, F. , Zohoncon, T. , Idani, B. , Ouattara, A. , Sorgho, P. , Obiri-Yeboah, D. , Bado, P. , Traore, M. , Diarra, B. , Yonli, A. , Ouedraogo, C. and Simpore, J. (2020) Association between Polymorphisms of Glutathione S-Transferase and Progression to Cervical Cancer in Women from Burkina Faso and Mali. *Journal of Biosciences and Medicines*, 8, 12-25. doi: 10.4236/jbm.2020.84002.
- 42- Agodi A, Barchitta M, Cipresso R, Marzagalli R, La Rosa N, Caruso M, Castiglione MG, Travali S. Distribution of p53, GST, and MTHFR polymorphisms and risk of cervical intraepithelial lesions in sicily. *Int J Gynecol Cancer*. 2010 Jan;20(1):141-6. doi: 10.1111/IGC.obo13e3181c20842. PMID: 20130515.