



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MARIA CECÍLIA RAMIRO TALARICO

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SOD2 NO PROGNÓSTICO DO
CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO ESTÁGIO IIIB

*ANALYSIS OF SOD2 PROTEIN AS PROGNOSTIC FACTOR IN STAGE IIIB
CERVICAL CARCINOMA*

CAMPINAS

2018

MARIA CECÍLIA RAMIRO TALARICO

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SOD2 NO PROGNÓSTICO DO
CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO ESTÁGIO IIIB

*ANALYSIS OF SOD2 PROTEIN AS PROGNOSTIC FACTOR IN STAGE IIIB
CERVICAL CARCINOMA*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde, na área de concentração de Oncologia Ginecológica e Mamária.

Master's dissertation, presented to the Postgraduate Program in Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, as a prerequisite to obtain the title of Master in Medical Sciences, area of concentration in Gynecologic Oncology and Breast Cancer Area.

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CARLOS ZEFERINO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA MARIA CECÍLIA RAMIRO TALARICO, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. LUIZ CARLOS ZEFERINO.

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 304299/2014-6; CAPES
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1646-9754>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

T141a Talarico, Maria Cecilia Ramiro, 1987-
Análise da expressão da proteína SOD2 no prognóstico do carcinoma do colo do útero estágio IIIB / Maria Cecilia Ramiro Talarico. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Luiz Carlos Zeferino.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Biomarcadores tumorais. 2. Superóxido dismutase. 3. Neoplasias do colo do útero. 4. Prognóstico. 5. Análise de sobrevivência. I. Zeferino, Luiz Carlos, 1955-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Analysis of SOD2 protein as prognostic factor in stage IIIB cervical carcinoma

Palavras-chave em inglês:

Biomarkers, tumor

Superoxide dismutase

Uterine cervical neoplasm

Prognosis

Survival Analysis

Área de concentração: Oncologia Ginecológica e Mamária

Titulação: Mestra em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Luiz Carlos Zeferino [Orientador]

Diana Bhadra Andrade Peixoto do Vale

Silvia Helena Rabelo dos Santos

Data de defesa: 27-08-2018

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

MARIA CECÍLIA RAMIRO TALARICO

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CARLOS ZEFERINO

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. LUIZ CARLOS ZEFERINO**
 - 2. PROFA. DRA. DIAMA BHADRA ANDRADE PEIXOTO DO VALE**
 - 3. PROFA. DRA. SILVIA HELENA RABELO DOS SANTOS**
-

Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DATA DA DEFESA: 27/08/2018

Dedico este trabalho à minha avó Elza, que sempre foi o exemplo de força, fé e dedicação de nossa família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas oportunidades que aqui tive. Pelas pessoas que cruzaram meu caminho e por todo aprendizado que me proporcionaram.

Agradeço à minha família, por me dar suporte em todos os momentos, estando sempre presente. À minha mãe, Suely, por me mostrar a importância da educação e do conhecimento. Foi devido as suas escolhas e sacrifícios que estou colhendo mais este fruto. Ao meu irmão, Lucas, que me mostra um mundo cheio de aventuras e me traz de volta à realidade quando preciso.

Ao meu namorado, Bruno, por toda compreensão e suporte que me dá. Por me aconselhar e me mostrar que tudo tem outro lado. Por me proporcionar os melhores momentos de respiro e descontração. Por me acompanhar em todo processo, lendo e sugerindo modificações. Por me mostrar que quando a gente quer tudo é possível.

Agradeço às minhas amigas pelo companheirismo e por tudo que compartilhamos. À Má, pela cumplicidade, por me encorajar, auxiliar e possibilitar que meu mestrado fosse muito mais rico do que eu poderia imaginar. À Carol pela disposição para ajudar, ensinar e dividir a bancada, mesmo quando não havia espaço. À Mari pelas conversas encorajadoras e pelos momentos de descontração. À Maira e a Guta pela pelas risadas e pelos momentos de diversão.

À Rafaella e à Gabriela do ICESP que me auxiliaram na realização das reações deste trabalho. À Dra. Lara pelos esclarecimentos e por ter possibilitado esta parceria.

À Dra. Liliana e Dra. Larissa que me ajudaram na busca e na leitura dos casos deste projeto. Ao pessoal do blocário, Luzia e demais funcionários da Anatomia Patológica, que tornaram a realização deste trabalho possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia por possibilitar estar entre tantas pessoas qualificadas e pelas oportunidades de crescimento que aqui tive. Por ter me dado o suporte necessário pra que eu tornasse minha experiência de mestrado mais rica e completa.

Ao Fernando Guimarães pelos conselhos, pela oportunidade de conhecer novas áreas, pela confiança de trabalhar em seu laboratório e fazer parte de uma ótima equipe.

À toda equipe do LAPE e à Dra. Geisi que muito me auxiliaram durante o aprendizado para realização deste estudo. Ao Júlio que sempre foi muito solícito, tirando minhas dúvidas e me auxiliando no que fosse necessário.

Aos profissionais do *Hospital Clínic* de Barcelona que estiveram comigo me mostrando seu trabalho, principalmente à Esther, que esteve sempre comigo compartilhando não só seu conhecimento, como sua cultura tão rica e bonita. Ao Dr. Jaume e Dra. Marta Del Pino que me abriram as portas para que tudo isso fosse possível.

Aos profissionais do Laboratório Clínicos Especializados do CAISM e os trabalhadores do Laboratório de Citopatologia que além dos momentos de descontração, sempre foram muito solícitos e dispostos a ajudar.

Ao Helymar Machado, estatístico do Hospital CAISM, pela ajuda fundamental e pelo trabalho impecável realizado para esta pesquisa.

As pacientes que gentilmente aceitaram participar do estudo e contribuíram muito para minha formação científica e, sobretudo, pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro na forma de bolsa de estudo.

Por fim, agradeço ao meu orientador Dr. Luiz Carlos Zeferino por idealizar um projeto que me abriu tantas portas, que me permitiu conhecer tantas pessoas e aprender muito mais do que eu poderia imaginar. Sou grata por cada momento que vivenciei nesse período, por cada dificuldade superada e por cada conhecimento adquirido.

*“Uma boa mente e um bom coração são
sempre uma combinação formidável.
Mas quando você adiciona a isso um idioma
bem falado ou uma caneta, então
você tem uma coisa realmente especial”.*

Nelson Mandela

RESUMO

Introdução: O câncer do colo do útero é uma doença neoplásica maligna muito frequente, porém evitável. Foram estimados 528.000 casos novos da doença no mundo, no ano de 2012. No Brasil, a estimativa para 2018 é de 16.370 casos novos da doença. O desenvolvimento de ferramentas clínicas para apoio diagnóstico, terapêutico e seguimento das neoplasias malignas pode qualificar o cuidado em benefício da paciente. A proteína SOD2 faz parte da família de metaloenzimas atuantes no sistema celular antioxidante por catalisar a conversão do ânion de superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em um processo conhecido como dismutase. A maioria dos estudos sobre a expressão de SOD2 e o câncer mostra que a superexpressão dessa enzima está associada com a presença de metástase e um mau prognóstico em muitas doenças malignas. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar se a expressão da proteína SOD2 está associada com o prognóstico do carcinoma do colo do útero avançado. **Metodologia:** Trata-se de uma coorte cuja amostra foi constituída a partir das mulheres incluídas no ensaio clínico prospectivo *Concomitant cisplatin plus radiotherapy and high-dose-rate brachytherapy versus radiotherapy alone for stage IIIB epidermoid cervical cancer: a randomized controlled trial*, conduzido no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Brasil. No total, 147 mulheres foram incluídas, 72 mulheres no grupo que recebeu cisplatina concomitante a radioterapia (QT/RT) e 75 mulheres no grupo que recebeu apenas radioterapia (RT) e foram seguidas por sete anos. A amostra deste estudo foi constituída por 63 mulheres que ainda dispunham de blocos com material suficiente para reanálise com hematoxilina e eosina (HE) e os ensaios imuno-histoquímicos. A avaliação da expressão da SOD2 pela imuno-histoquímica baseou-se no percentual de células coradas e na intensidade da coloração, analisados separadamente e juntos utilizando um *score*. As análises do percentual de células coradas foram realizadas em três pontos de corte (50%, 75% e 90% de células coradas), e cada ponto de corte avaliado gerou um *score* específico, categorizado como alto e baixo. Dados de recidiva e óbito foram comparados com os da avaliação imuno-histoquímica. As curvas da sobrevida livre de doença e sobrevida global foram avaliadas por Kaplan-Meier e Log-rank. Fatores associados às sobrevidas foram analisados pela regressão de Cox. **Resultados:** A intensidade da coloração foi

analisada separadamente e junto com o percentual de células coradas para qualquer ponto de corte estão associados com a recorrência. Casos com mais de 90% de células coradas e com alto *score* de 75% estão associados com óbito também. O alto *score* de 90% foi associado com a recidiva, recidiva sistêmica e o óbito. Sobrevida livre de doença e sobrevida global foram piores em mulheres cujo carcinoma teve mais de 90% de células coradas e naqueles com alto *score* de 75% e 90%. **Conclusão:** A forte intensidade de coloração e o alto percentual de células coradas para a proteína SOD2 estão relacionados com a recorrência e também com a sobrevida global de carcinoma do colo do útero estágio IIIB.

Palavras-chave: Biomarcadores tumorais, Superóxido Dismutase, Neoplasias do Colo do Útero, Carcinoma de Células Escamosas, Análise de Sobrevida, Prognóstico.

ABSTRACT

Background: Cervical cancer is a very common malignant neoplastic disease, however avoidable. Estimates indicate that 528.000 new cases were diagnosed worldwide in 2012. In Brazil, it is estimated 16.370 new cases of the disease by the end of 2018. The development of clinical tools for diagnosis, treatment and follow-up of malignant neoplasms can support a better quality treatment and benefit patients. The protein SOD2 is part of the family of metalloenzymes acting in the antioxidant cell system by catalyzing the conversion of the superoxide anion (O_2^-) into hydrogen peroxide (H_2O_2) in a process known as dismutase. Most studies on SOD2 expression and cancer showed that the high expression of this protein is associated with the presence of metastasis and poor prognosis in many malignancies. This study aimed to evaluate whether SOD2 protein expression is associated with the prognosis of cervical carcinoma stage IIIB. **Methodology:** This study had patients selected from a cohort consisting of tumor samples from women included in the prospective clinical trial named as “Concomitant cisplatin plus radiotherapy and high-dose-rate brachytherapy versus radiotherapy alone for stage IIIB epidermoid cervical cancer: a randomized controlled trial”, conducted at the Women's Hospital Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti, State University of Campinas (UNICAMP), Brazil. From the 147 women included, 72 received cisplatin concomitantly with radiotherapy (CRT) and 75 women received radiotherapy alone (RT) and were followed-up to seven years. The sample of this study consisted of 63 women who had blocks available to be reanalyzed with hematoxylin and eosin (HE) and immunohistochemistry assay. The evaluation of SOD2 expression by immunohistochemistry assay was based on the percentage of stained cells and the staining intensity, analyzed separately and together by a score. The analyses of the percentage of stained cells was performed using three cut points (50%, 75% and 90% of stained cells), and each cut point generated a specific score, and then categorized as high or low. Relapse and death data were compared to immunohistochemistry evaluation. Disease-free survival and overall survival curves were performed using the Kaplan-Meier method and the log-rank test. Factors associated with the survivals were analyzed by Cox Proportional Hazards Regression. **Results:** The intensity of staining analyzed separately and together to the percentage of cells stained for any cut-off point are both associated with recurrence. Cases with more than 90% stained cells and with high 75% score

was also associated with death. High 90% score was associated with recurrence, distant recurrence and death. Disease-free survival and overall survival were worse in women whose carcinoma had more than 90% stained cells and those with high 75% score and 90% score. **Conclusion:** Strong intensity and high percentage of stained cells for SOD2 protein it is related to relapse and overall survival of squamous cell carcinoma of the cervix IIB.

Key-words: Biomarkers Tumor, Superoxide Dismutase, Uterine Cervical Neoplasms, Squamous Cell Carcinoma, Survival Analysis, Prognosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAISM	- Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
ERO	- Espécies reativas ao oxigênio
FCM	- Faculdade de Ciências Médicas
FIGO	- Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
H₂O₂	- Peróxido de hidrogênio
HE	- Hematoxilina e Eosina
HPV	- Papilomavírus humano
HSIL	- Lesão Intraepitelial de alto grau
LSIL	- Lesão Intraepitelial de baixo grau
MnSOD	- Superóxido dismutase dependente do Manganês
NIC	- Neoplasia Intraepitelial Cervical (grau)
O₂⁻	- Ânion de superóxido
QT/RT	- Quimiorradioterapia
ROC	- <i>Receiver Operating Characteristic curve</i>
RT	- Radioterapia
SOD	- Superóxido dismutase
SOD2	- Superóxido dismutase 2
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UNICAMP	- Universidade Estadual de Campinas
USP	- Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo Geral	22
2.2. Objetivos Específicos	22
3. METODOLOGIA.....	23
3.1. Desenho do estudo e seleção dos casos.....	23
3.2. Variáveis	24
3.2.1. Variáveis dependentes	24
3.2.2. Variáveis independentes.....	25
3.2.3. Variáveis confundidoras.....	25
3.3. Tratamentos, Técnicas e Exames.....	25
3.3.1. Tratamento e Seguimento	25
3.3.2. Reações de Imuno-histoquímica.....	26
3.3.2.1. Imuno-histoquímica para detecção de SOD2	26
3.3.2.2. Detecção imuno-histoquímica.....	27
3.3.2.3. Cálculo do score	28
3.4. Análise Estatística.....	29
4. RESULTADOS	30
5. CONCLUSÃO.....	50
6. REFERÊNCIAS.....	51
7. ANEXOS	58
Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP	58
Anexo 2: Aprovação da Emenda do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP	62
Anexo 3: Aprovação do Ensaio Clínico pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP	66

1. INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é um importante problema de saúde pública porque é uma doença neoplásica maligna muito frequente, porém evitável. Foram estimados 528.000 casos novos da doença no mundo, no ano de 2012, com 266.000 mortes, correspondendo a 7,5% das causas de morte por câncer na população feminina. Cerca de 85% dos casos de câncer do colo do útero ocorrem em países menos desenvolvidos. Países europeus, Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália apresentam as menores taxas, enquanto países da América Latina e, principalmente, das regiões subsaarianas na África, apresentam taxas elevadas (1).

No Brasil, a estimativa para 2018 é de 16.370 casos novos da doença, com um risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres. Em 2013, ocorreram 5.430 óbitos por esta doença, representando uma taxa de mortalidade ajustada para a população mundial de 4,86 óbitos para cada 100 mil mulheres (2,3).

O câncer do colo do útero caracteriza-se pela replicação desordenada do epitélio de revestimento, induzida pela infecção persistente pelo papiloma vírus humano (HPV) (4). O processo inicia-se pelo desenvolvimento de lesões precursoras conhecidas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC). A progressão de lesões precursoras para neoplasias invasoras geralmente ocorre lentamente, o que permite identificá-las em tempo de estabelecer medidas terapêuticas a fim de impedir o desenvolvimento para o câncer (5). Os tipos de HPV mais carcinogênicos são os 16 e 18, responsáveis por cerca de 50% das neoplasias intraepiteliais grau 3 (NIC3) e 70% dos carcinomas invasores (6).

Há outros fatores associados que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer de colo uterino como: o início precoce da atividade sexual (que apresenta maior risco para infecção pelo HPV), multiparidade, uso de contraceptivos orais, tabagismo, coinfeção por outros agentes sexualmente transmissíveis, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou outras imunodeficiências (7).

O câncer do colo do útero é um dos cânceres com maiores chances de ser prevenido, pois demora muitos anos para se desenvolver a partir de lesões precursoras que são detectáveis pelo rastreamento citológico ou pelo teste de HPV. A detecção e tratamento de lesões precursoras evita a progressão para carcinoma invasor. O rastreamento permite ainda o diagnóstico do carcinoma invasor em

estágios iniciais e assintomáticos, condição que está associada à maior eficácia terapêutica (8). Dados evidenciam a redução da mortalidade pelo carcinoma do colo do útero em países que têm realizado o rastreamento de forma organizada ao longo de algumas décadas (9).

Mulheres com tumores iniciais podem não apresentar sintomas. Em estágios avançados está relacionado com sangramento vaginal anormal e dor. Os sintomas aparecem de acordo com a evolução do tumor. Quando ocorre lateralmente, com extensão até o paramétrio, pode causar obstrução ureteral ocasionando anúria e uremia; com extensão até parede pélvica lateral, pode causar dor ciática e também linfedema das extremidades inferiores. Já quando o crescimento é no sentido postero-anterior os sintomas são aumento na frequência urinária, dor na bexiga e hematúria, o que pode avançar até obstrução da saída da bexiga causando retenção urinária e, em alguns casos, fístula vesicovaginal. A extensão tumoral posterior pode ocasionar dor lombar, fistula retovaginal e tenesmo (10).

Mais recentemente surgiu a vacinação contra o HPV como estratégia de prevenção primária do câncer do colo do útero, também adotada no Brasil pelo Ministério da Saúde no Programa Nacional de Imunização a partir de 2014, para meninas, e de 2017 para meninos (11). Todavia, o benefício desta estratégia deverá se manifestar de forma mais evidente depois de três décadas para o conjunto de mulheres que foi apropriadamente vacinado.

Os tipos histológicos de carcinoma do colo do útero mais frequentes são carcinoma de células escamosas (ou epidermóide), representando cerca de 70% dos tumores, e adenocarcinoma, responsável por cerca de 15 a 35% dos casos (12). Outros tipos histológicos que acometem o colo do útero, são adenoescamosos (5 a 7% dos casos) e tipos mais raros como adenóides, neuroendócrinos, carcinóides entre outros (13).

A histologia do tumor parece ter uma importante relação com a sobrevida. Mulheres com carcinoma do colo do útero estágio IB1 e em estágio IIIB, com tumor de células escamosas, apresentaram sobrevida específica superior às mulheres com adenocarcinoma. Em doença avançada, mulheres com adenocarcinoma também apresentaram menores índices de sobrevida global. Sendo assim, mulheres com adenocarcinoma apresentam pior prognóstico (14).

O estadiamento avalia o grau de disseminação da neoplasia, podendo ser patológico e/ou clínico. O estadiamento clínico do carcinoma invasor do colo do útero segue recomendações estabelecidas pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), de I a IV. No estágio I o tumor está confinado no colo do útero; no estágio II ultrapassa os limites do útero, porém, sem atingir a parede óssea ou restrito ao terço superior da vagina; no estágio III atinge a parede pélvica e/ou terço inferior da vagina e/ou hidronefrose ou rim não funcionante; no estágio IV, há envolvimento clínico da mucosa da bexiga e/ou reto, ou o tumor se estende além da pelve verdadeira (15).

No Brasil, principalmente em regiões menos favorecidas socialmente, um percentual significativo dos casos de carcinoma do colo do útero tem sido diagnosticado em fase avançada, o que ainda deverá ocorrer por algumas décadas (16,17). Registros hospitalares entre 2000 e 2009, mostraram que quase 40% das mulheres recebem o diagnóstico no estágio III e 7% no estágio IV (18).

Em geral, o tratamento cirúrgico está indicado até o estágio IB1, ou seja, a lesão é restrita ao colo do útero e tem até 4cm em seu maior diâmetro. A radioterapia associada a quimioterapia é o tratamento recomendado para os carcinomas invasores estágios IB2 ou mais avançados (19). Os principais fatores prognósticos associados à sobrevida são: estágio, invasão linfonodal, volume do tumor, profundidade da invasão estromal, invasão do espaço linfovascular e, em menor grau, tipo histológico e grau de diferenciação (20).

O 26º relatório anual da FIGO, publicado em 2006, (*FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer*) sobre resultados do tratamento do câncer do colo do útero incluiu uma análise de fatores prognósticos com base em dados 11.775 mulheres tratadas entre 1999 e 2001, tendo como desfecho sobrevida global em cinco anos. O fator prognóstico mais importante foi o estágio clínico da doença no momento do diagnóstico. Sendo assim, os demais fatores prognósticos foram submetidos à análise multivariada de acordo com os estágios diagnósticos. O adenocarcinoma e o carcinoma de células claras tendem a apresentar pior prognóstico do que o carcinoma epidermóide em todos os estágios, porém, o carcinoma adenoescamoso somente no estágio IV. Os carcinomas com graus histológicos II e III têm pior prognóstico apenas para o estágio I. Metástases linfonodais e envolvimento do espaço linfovascular têm pior prognóstico para os

estágios I e II, porém tumores maiores que 4cm têm pior prognóstico para os estádios I a III (20).

As decisões terapêuticas para doença recorrente devem ser baseadas na avaliação do *performance status*, sítio de recorrência e/ou metástases, extensão da doença metastática e tratamento prévio (21). As pacientes com doença metastática limitada e um bom *performance status*, a utilização da quimioterapia com esquema duplo baseado em platina pode ser justificável, mas ainda assim, os benefícios são limitados, considerando as limitações das taxas de resposta e na sobrevida livre de doença (22).

A *International Gynecologic Cancer Society* e a *European Society of Gynaecological Oncology* propõem para o seguimento, após o tratamento das mulheres com carcinoma invasor do colo do útero, exame físico e colpocitologia oncológica. Exames de imagem estariam indicados se a mulher apresentar algum sintoma ou sinal clínico que possa estar associado com recorrência da doença (23,24). Atualmente não há nenhum marcador que aplicaria ao acompanhamento da mulher tratada por carcinoma do colo do útero.

Recidiva pélvica após cirurgia primária pode ser tratada com quimiorradioterapia. Radioterapia radical (com ou sem quimioterapia concomitante) pode resultar em sobrevida livre de doença em cinco anos de 45-74% nas recidivas pélvicas isoladas após cirurgia primária (25,26). A extensão da doença recorrente e envolvimento de linfonodos pélvicos são fatores prognósticos para sobrevida (27). Alguns casos se beneficiam com cirurgia radical neste momento, mas a recidiva precisaria ser detectada precocemente (28).

Atualmente, há muito interesse no desenvolvimento de ferramentas clínicas e de diagnóstico, principalmente na oncologia. Os biomarcadores podem apresentar sinais que serviriam como indicador de respostas farmacológicas em intervenções terapêuticas ou de processos biológicos normais e patogênicos. Podem também detectar precocemente a recorrência do carcinoma do colo do útero para que se tenha a oportunidade de oferecer à paciente alguma possibilidade ainda curativa ou que pelo menos possa prolongar sua sobrevida (29).

O interesse pela proteína superóxido dismutase 2 (SOD2) no câncer do colo do útero deriva-se do resultado da análise do perfil de transcrição global de queratinócitos normais e imortalizados com HPV, que mostrou expressão diferenciada do gene superóxido dismutase 2 (SOD2) em associação com a

resposta inflamatória (30). A proteína SOD2 faz parte da família de metaloenzimas atuantes no sistema celular antioxidante por catalisar a conversão do ânion de superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em um processo conhecido como dismutase, que ocorre por meio da reação: $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (31,32). Essas duas moléculas fazem parte de um grupo conhecido como espécies reativas ao oxigênio (ERO), que engloba várias moléculas que contêm oxigênio e recebem um elétron extra, derivado do metabolismo intracelular, o que as permite oxidar outras células (33,34). Em células eucarióticas, processos metabólicos são os responsáveis pela geração de ERO. Entre eles, a respiração mitocondrial está como principal fonte geradora de ERO, que produz O_2^- a partir da cadeia de transporte de elétrons (33). O H_2O_2 , produto da dismutação, é uma ERO mais estável que o O_2^- e pode ainda ser metabolizado por outras enzimas como a catalase, por exemplo (35), porém, ainda assim, é capaz de produzir de forma rápida modificações oxidativas funcionais (36). Em mamíferos, foram identificadas e caracterizadas três distintas isoformas de superóxido dismutase (SOD), SOD1 (citoplasmática), SOD2 (mitocondrial) e SOD3 (extracelular). Porém, dentre as três, a única que há evidências de que seja essencial para a sobrevivência de organismos aeróbicos é a SOD2 (37,38). Conhecida também como superóxido dismutase dependente do Manganês (MnSOD), é codificada pelo gene SOD2 localizado no cromossomo 6q25.3 e está localizada na matriz mitocondrial (31,37,39).

A função da SOD2 na iniciação e progressão do câncer ainda é pouco conhecida. Análises realizadas *in-vitro* demonstraram que a superexpressão de membros da família SOD está correlacionada com o aumento da diferenciação celular, redução do crescimento e proliferação celular, e reversão do fenótipo maligno (40). Além disso, a redução do estresse oxidativo a partir do aumento dos níveis de SOD2 pode evitar danos no DNA e o desenvolvimento do câncer. Corroborando com isso, estudos em linhagens celulares transformadas relatam que a SOD2 exerce uma função protetora contra a progressão tumoral (41–43). Por outro lado, a atividade da SOD2 pode impedir a acumulação de H_2O_2 , prevenindo a morte celular programada ou o início da necrose, favorecendo assim o fenótipo maligno (37,44,45).

Existe uma possível dicotomia na qual a SOD2 pode ser considerada um antioxidante protetor e redutor de superóxido, assim como um fator pró-oxidante que atuaria na ativação das vias oncogênicas e promoveria a progressão do câncer (46).

Todavia, o entendimento atual converge para o consenso de que as células do câncer exibem uma ampla variedade de fenótipos metabólicos que, em comparação às células normais, acumulam o excesso de ERO induzindo danos celulares. Com isso, pode ocorrer o desenvolvimento do câncer, assim como seu fenótipo metabólico (33,34,36,45).

Na verdade, a maioria dos estudos que avaliou a expressão de SOD2 no câncer mostrou que há associação entre a alta expressão dessa enzima com a presença de metástase e com mau prognóstico em muitas doenças malignas. Termini *et al.* (2015) avaliaram 125 amostras de carcinoma de células escamosas do pênis, utilizando imuno-histoquímica e encontraram que a expressão de SOD2 estava associada a presença metástase de linfonodos regionais (47).

Já na avaliação de câncer de esôfago, foram utilizadas 258 amostras de duas coortes independentes. A expressão de SOD2 foi aumentada em amostras de tecido tumoral, em comparação com tecidos sem a neoplasia. Além disso, a média da sobrevida global de pacientes que tiveram alta expressão de SOD2 foi menor que a dos pacientes que tiveram baixa expressão. Dessa forma, a SOD2 indicou mau prognóstico da doença (48).

Em câncer de pulmão observou-se baixa sobrevida global e baixa sobrevida livre de doença em pacientes com tumores positivos para SOD2 em comparação com os pacientes SOD2 negativo. Além disso, foi feita uma análise *in-vitro*, na qual a SOD2 aumentou o potencial de invasão, migração celular e crescimento de colônia independente de ancoragem. Os autores concluíram que a SOD2 pode promover a agressividade do tumor e prever a sobrevida e a recidiva (49).

Um estudo, utilizando amostras de biópsias congeladas dos tecidos de pulmão, cólon e próstata, mostrou que durante a progressão tumoral dos três tecidos avaliados, a SOD2 se apresentou expressa em maiores quantidades quando comparada com seus controles. Somado a isso, também foi encontrado um nível de SOD2 aumentado em tecidos metastáticos, em comparação aos do tecido primário, havendo destaque quando o tumor primário era de cólon. Com isso, a SOD2 poderia ser considerada um marcador associado à progressão do tumor para metástase (50).

Resultados que reforçaram a associação da SOD2 com mau prognóstico também foram encontrados em linfoma (51,52), glioblastoma (53), bexiga (54), câncer oral (55) e colorretal (56).

Um estudo que avaliou a expressão de SOD2 em lesões do epitélio do colo do útero, por meio da técnica de imuno-histoquímica, analisou 331 amostras que incluiu lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial de alto grau (HSIL), carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma. Os autores observaram que a coloração da SOD2 aumentou com a severidade da doença. Coloração intensa foi observada em 13% da LSIL, 25,5% da HSIL, 40% do carcinoma de células escamosas e 65,4% do adenocarcinoma (57).

Tendo como referência a LSIL, os autores encontraram diferença estatística significativa entre a associação da coloração intensa da SOD2 no carcinoma de células escamosas e no adenocarcinoma, mas não encontraram diferenças para HSIL. Os autores concluíram que estes resultados indicariam que a SOD2 poderia ser testada como biomarcador para o carcinoma do colo do útero (57). A LSIL, que corresponde a NIC1, não tem sido considerada como lesão precursora, mas apenas como representação morfológica da replicação de HPV. A HSIL inclui NIC 2 e NIC 3, sendo que apenas a segunda pode ser considerada a verdadeira lesão precursora porque está presente a instabilidade genética provocada pelas oncoproteínas do HPV (58).

Em um estudo mais recente, foram avaliadas 297 amostras de tecido cervical não neoplásico, NIC 3, carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma. Os resultados apresentados mostraram que a coloração da SOD2 também aumentou com a severidade da doença. Foi observada coloração intensa em 3% das amostras de tecido cervical não neoplásico, 52% de NIC 3, 64% de carcinoma de células escamosas e 82% de adenocarcinoma (59).

Em resumo, a proteína SOD2 expressa diferencialmente de acordo com a gravidade da lesão do epitélio do colo do útero, porém não há conhecimento sobre sua possível associação prognóstica com esta neoplasia. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar se a expressão da proteína SOD2 está associada com o prognóstico do carcinoma do colo do útero estágio IIIB. Os resultados poderiam indicar se a identificação da proteína SOD2 poderia ser testada como marcador biológico com potencial uso na abordagem clínica das mulheres portadoras de carcinoma do colo do útero.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar se a expressão da proteína SOD2 está associada com o prognóstico do carcinoma do colo do útero estágio IIIB.

2.2. Objetivos Específicos

- Quantificar a expressão da proteína SOD2 nas mulheres com carcinoma do colo do útero estágio IIIB.
- Analisar se a expressão da proteína SOD2 está associada com a recorrência do carcinoma do colo do útero estágio IIIB.
- Analisar se a expressão da proteína SOD2 está associada com a sobrevida das mulheres com carcinoma do colo do útero estágio IIIB.

3. METODOLOGIA

3.1. Desenho do estudo e seleção dos casos

O estudo foi realizado no Hospital Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP – Plataforma Brasil (CAAE: 55014816.5.0000.5404) (Anexo 1 e 2). Trata-se de uma coorte cuja amostra foi constituída a partir das mulheres incluídas no ensaio clínico prospectivo *Concomitant cisplatin plus radiotherapy and high-dose-rate brachytherapy versus radiotherapy alone for stage IIIB epidermoid cervical cancer: a randomized controlled trial*. Aquele ensaio clínico também teve aprovação do CEP da FCM-UNICAMP (Protocolo Nº 238/2003) (Anexo 3) e todas as mulheres incluídas assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os critérios de inclusão daquele ensaio clínico foram: diagnóstico de carcinoma escamoso do colo de útero estágio IIIB no período de setembro de 2003 a julho de 2010, constatado por um oncologista ginecológico experiente e um médico radioterapeuta, tendo como base exame pélvico completo, cistoscopia e retossigmoidoscopia quando indicados, raios-x de tórax, ultrassonografias pélvica e abdominal, clearance da creatinina com mais de 60 mL/min/1,73 m², enzimas hepáticas normais, escala de Karnofsky mais de 70%, níveis basais de hemoglobina ≥ 10 mg/dL. No total, 147 mulheres foram aleatorizadas em dois grupos, 72 mulheres no grupo que recebeu cisplatina concomitante a radioterapia (QT/RT) e 75 mulheres no grupo que recebeu apenas radioterapia (RT) (60).

Dentre as 147 mulheres incluídas no ensaio clínico, 49 mulheres não dispunham de blocos para os procedimentos previstos neste estudo e 35 mulheres tiveram a biópsia diagnóstica realizada em outros serviços. Assim, após busca criteriosa, a amostra deste estudo foi constituída por 63 mulheres que ainda dispunham de blocos com material suficiente para reanálise com hematoxilina e eosina (HE) e os ensaios imuno-histoquímicos. Os blocos foram novamente cortados e corados em HE para verificação do tecido correspondente, e a qualidade do componente tumoral. Quando a mulher tinha mais de um bloco, o patologista responsável escolheu o de melhor qualidade, visando maior área tumoral e melhor

estado de conservação do tecido. Os ensaios imuno-histoquímicos foram realizados no Laboratório de Inovação em Câncer - Centro de Investigação Translacional em Oncologia (Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de São Paulo - USP) e para 8 mulheres a reação não funcionou. Portanto, as análises foram feitas para 55 mulheres, sendo que 28 eram do grupo QT/RT e 27 do grupo RT.

Por se tratar de uma avaliação retrospectiva de material biológico parafinado oriundo de um estudo já concluído, o CEP da FCM-UNICAMP dispensou a utilização do TCLE.

Este estudo seguiu as normas de pesquisa da FCM-UNICAMP, respeitando os princípios éticos promulgados pela Declaração de Helsinque (2000) e seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos contidas na resolução 466/2012 do Ministério da Saúde do Brasil.

3.2. Variáveis

3.2.1. Variáveis dependentes

Resposta terapêutica: A avaliação clínica da resposta terapêutica foi realizada um mês após o término do tratamento designado, como presença ou ausência do tumor (61). A avaliação da resposta terapêutica foi definida no ensaio clínico, reportando-se neste estudo como: com resposta completa (desaparecimento de todas as lesões alvo) e sem resposta completa.

Sobrevida Livre de doença: Intervalo de tempo em meses entre o fim do tratamento com radioterapia até o diagnóstico de alguma recorrência da doença, diagnosticada com base em sinais e sintomas, exame clínico e propedêutica subsidiária (62).

Sobrevida Global: Intervalo de tempo em meses entre o início do tratamento e óbito da paciente por qualquer causa (63).

Toxicidade ao tratamento: A toxicidade ao tratamento foi classificada no ensaio clínico de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Radiation Therapy Oncology Group* (graus de 1 a 5) e foi analisada neste estudo como duas variáveis, toxicidade aguda e toxicidade no seguimento, ambas classificadas de acordo com sua presença como sim ou não (64).

3.2.2. Variáveis independentes

Percentual de células coradas: avaliado em três pontos de corte: 50%, 75% e 90% de células coradas. A categorização foi baseada no ponto de corte, sendo atribuído o valor de 1, quando o percentual de células coradas foi menor que o ponto de corte analisado e 2, para percentual de células coradas igual ou maior ao ponto de corte.

Intensidade da coloração: foi classificada em valores: 1, para coloração fraca; 2, para coloração moderada; e 3, para coloração forte.

Score: foram multiplicados os valores atribuídos para intensidade da coloração pelo percentual de células coradas, para cada ponto de corte avaliado (50%, 75% e 90% de células coradas). Os valores de scores possíveis foram 1, 2, 3, 4 e 6; categorizados como baixo score, quando menor que 5, e alto score, quando maior que 5.

3.2.3. Variáveis confundidoras

Idade: Número de anos que uma pessoa relatou no diagnóstico do carcinoma do colo do útero, coletada no banco de dados do ensaio clínico.

Grau histológico: Classificado de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (10), coletada no banco de dados do ensaio clínico.

Tipo do tratamento utilizado: No ensaio clínico as pacientes foram randomizadas para se submeter radioterapia associada à quimioterapia sensibilizante (QT/RT) ou a radioterapia exclusiva (RT) (60).

3.3. Tratamentos, Técnicas e Exames

3.3.1. Tratamento e Seguimento

As mulheres foram submetidas ao tratamento de acordo com o protocolo do ensaio clínico acima referido. Em síntese, todas as mulheres receberam teleterapia com dose de 45Gy para a região pélvica em 25 frações, 14,4Gy de reforço nos paramétrios comprometidos e braquiterapia de alta taxa de dose em quatro frações semanais de 7Gy, prescritos no ponto A. As mulheres do grupo QT/RT também receberam semanalmente quimioterapia sensibilizante com cisplatina (40mg/m²) concomitante com a teleterapia.

Para avaliação da recidiva, a resposta ao tratamento foi avaliada um mês após o seu término. O seguimento das mulheres tratadas foi realizado a cada quatro meses nos dois anos posteriores ao tratamento, a cada seis meses no terceiro ano e após isso, uma vez por ano, sendo o período de seguimento realizado até junho de 2013. Os exames realizados no seguimento foram: exame pélvico completo (exame especular, toque vaginal e toque retal), raios-x de tórax, ultrassonografias pélvicas e abdominais, citologia do fundo vaginal (60).

3.3.2. Reações de Imuno-histoquímica

As amostras selecionadas a partir dos blocos de parafina do exame diagnóstico, correspondentes às lâminas de HE observadas, seguiram os seguintes preparativos para a realização e análise das reações a partir da técnica de imuno-histoquímica.

3.3.2.1. Imuno-histoquímica para detecção de SOD2

Foram realizados cortes de 4 micrômetros em tecidos previamente fixados em formalina, incluídos em parafina. As reações de imuno-histoquímica foram realizadas por meio da reação automatizada utilizando-se o *ultraView Universal DAB Detection kit*® (Ventana Medical Systems, Inc., Roche, Tucson, Arizona) em equipamento Ventana BenchMark GX (Roche Diagnostics, Mannheim Germany) (figura 1), conforme instruções do fabricante. Todas as reações foram feitas com controle externo.



Figura 1: Equipamento Ventana BenchMark GX

Para a detecção das proteínas alvo foi utilizado anticorpo policlonal de coelho dirigido contra a proteína SOD2 (ab 13533, Abcam, Cambridge, USA), na concentração 1:1000. Após o processo de recuperação antigênica, foi realizada a inibição da atividade da peroxidase endógena, aplicação manual e incubação do anticorpo primário mencionado. O sistema de detecção utilizado é composto por um coquetel contendo anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho marcados com peroxidase, cuja reação cromogênica com diaminobenzidina resulta na formação de precipitado marrom/acastanhado.

3.3.2.2. Detecção imuno-histoquímica

A reação de positividade da imuno-histoquímica foi avaliada, por um único patologista do CAISM-UNICAMP com experiência em patologia ginecológica, de acordo com a intensidade da coloração e o percentual de células coradas em cada área representativa do diagnóstico histopatológico. Na análise, foram atribuídos valores para as variáveis analisadas para que fosse calculado o *score*. A intensidade da coloração foi classificada como: 1 (coloração fraca); 2 (coloração moderada); 3 (coloração forte). A proporção de células tumorais positivamente coradas foi avaliada em três pontos de corte: para 50%, classificadas como: 1 (menos que 50% de células tumorais positivas) e 2 (mais que 50% de células tumorais positivas); para 75%, classificadas como: 1 (menos que 75% de células tumorais positivas) e 2 (mais que 75% de células tumorais positivas); para 90%, classificadas como: 1 (menos

que 90% de células tumorais positivas) e 2 (mais que 90% de células tumorais positivas) (figura 2).

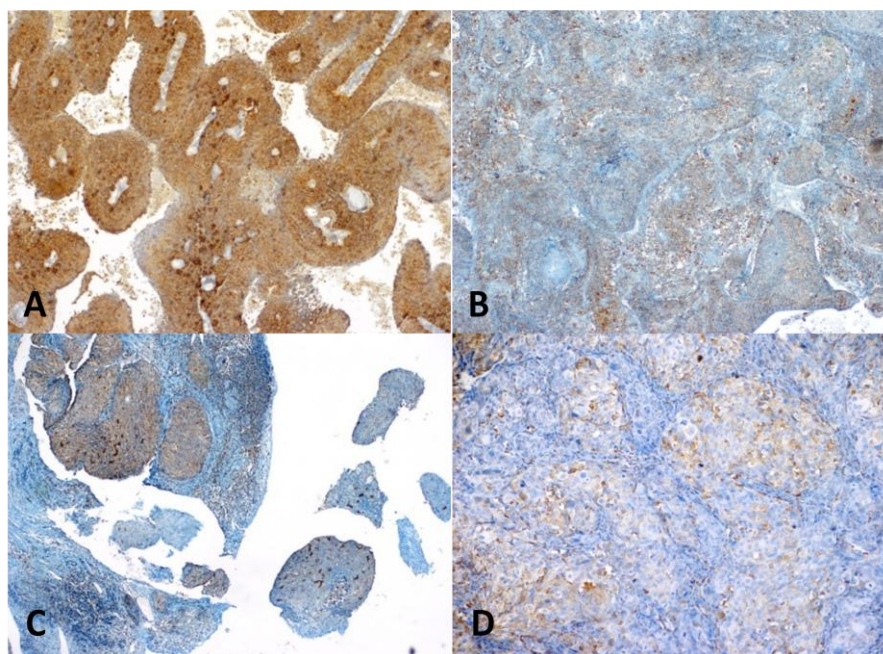


Figura 2: Reação imuno-histoquímica para SOD2 em carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado do colo uterino: **(A)** Expressão citoplasmática difusa em mais de 90% das células (4X). Observar a expressão forte, finamente granular citoplasmática (mitocondrial) (intensidade 3). **(B)** Expressão citoplasmática difusa em mais de 75% e menos de 90% das células (4X). Expressão fraca, finamente granular citoplasmática (intensidade 1). **(C)** Expressão citoplasmática difusa em mais de 50% e menos de 75% das células (4X). Expressão moderada, finamente granular citoplasmática (intensidade 2). **(D)** Expressão citoplasmática em menos de 50% das células (extensão 2) (4X). Expressão moderada (intensidade 2).

3.3.2.3. Cálculo do score

O cálculo do *score* foi feito, a partir da multiplicação dos valores atribuídos na detecção imuno-histoquímica, para a intensidade da coloração (1, 2 ou 3) pelo valor atribuído para o percentual de células coradas (1 ou 2) para cada ponto de corte avaliado (50%, 75% e 90%). Sendo assim, os valores possíveis para os *scores* avaliados foram 1, 2, 3, 4 e 6; categorizados como baixo *score*, quando menor que 5, e alto *score*, quando maior que 5.

3.4. Análise Estatística

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas, com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%), e estatísticas descritivas das variáveis numéricas, com valores de média, desvio padrão, valores mínimos, máximos e mediana.

A comparação das variáveis categóricas entre grupos foi feita a partir dos testes Qui-Quadrado ou exato de Fisher (para valores esperados menores que 5). A comparação das variáveis numéricas entre grupos utilizou o teste de Mann-Whitney (2 grupos), devido à ausência de distribuição normal das variáveis.

A análise das curvas de sobrevida livre de doença e sobrevida global utilizou o método de Kaplan-Meier, e para comparação das curvas foi usado o teste log-rank. Para estudar os fatores associados com a sobrevida foi utilizada a análise de regressão de Cox, univariada e multivariada.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0,05$. Além disso, foi considerado como resultado limítrofe quando p entre 0,05 e 0,10.

Para avaliar os valores dos scores para 50%, 75% e 90% de células coradas como preditores de recidiva e óbito, foram feitas análises da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic curve*), que indicou o score 5 como o melhor ponto de corte para todos os percentuais de células coradas avaliados.

4. RESULTADOS

International Journal of Cancer - Manuscript IJC-18-2082

International Journal of Cancer <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Sáb 14/07/2018, 09:38

Para:mcecilia_r@hotmail.com <mcecilia_r@hotmail.com>

14-Jul-2018

Manuscript number: IJC-18-2082

Dear Miss Talarico:

Thank you for submitting your manuscript entitled "High expression of SOD2 protein is a poor prognostic factor for squamous cell cervical carcinoma stage IIIB" by Talarico, Maria Cecilia Ramiro; Nunes, Rafaella Almeida Lima ; Silva, Gabriela Ávila Fernandes; Costa, Larissa Bastos Eloy; Cardoso, Marcella Regina; Zuliani, Antonio Carlos; Termini, Lara; Sarian, Luis Otavio ; Zeferino, Luiz Carlos. We will pass it on to the editors for evaluation after the paper is checked to ensure that our formal requirements have been followed.

To track the progress of your manuscript through the editorial process, simply point your browser to:

<https://mc.manuscriptcentral.com/ijc-wiley>

and log in using the following user ID and password:

(User ID): mcecilia_r@hotmail.com

https://mc.manuscriptcentral.com/ijc-wiley?URL_MASK=4a95815e74bd43e2aa4839c662619d87

May we also kindly ask you to always include the manuscript ID number IJC-18-2082 in any future correspondence regarding this article.

If you experience problems associated with the submission web site, please contact the support staff at: intjcanc@dkfz.de

Thank you again for your interest in the International Journal of Cancer and for submitting your paper to our journal.

Prof. Peter Lichter
Editor-in-Chief
International Journal of Cancer

Follow us on Facebook for the latest news from IJC:

<https://www.facebook.com/pages/International-Journal-of-Cancer/152748838233858#>

Title: High expression of SOD2 protein is a poor prognostic factor for squamous cell cervical carcinoma stage IIIB

Maria Cecília Ramiro Talarico¹, Rafaella Almeida Lima Nunes², Gabriela Ávila Fernandes Silva², Larissa Bastos Eloy Da Costa³, Marcella Regina Cardoso¹, Antonio Carlos Zuliani De Oliveira¹, Lara Termini², Luis Otavio Zanatta Sarian¹, Luiz Carlos Zeferino¹

1. Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas), Campinas, São Paulo, Brazil.

2. Innovation in Cancer Laboratory, Center of Translational Research in Oncology, Cancer Institute of São Paulo (ICESP - Instituto do Câncer do Estado de São Paulo), Faculty of Medicine of University of São Paulo (FMUSP - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo), São Paulo, São Paulo, Brazil.

3. Department of Pathology, State University of Campinas (UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas), Campinas, São Paulo, Brazil.

***Correspondence:**

Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino

Rua Alexander Fleming, 101 - Zip Code 13024-110, Campinas, Brazil.

Telephone: (+5519) 35219516

E-mail address: zeferino@fcm.unicamp.br

Abstract

Introduction: High SOD2 expression in cancer is associated with the presence of metastases and poor prognosis for many sites, as well in more severe stages for cervical cancer. The SOD2 expression seems to play role independently of HPV type in the carcinogenesis of the cervical epithelium. Nevertheless, there is no information for SOD2 protein expression and prognosis of cervical carcinoma and this is the purpose of this study.

Methods: Samples of 63 patients diagnosed with squamous cell cervical carcinoma stage IIIB from a clinical trial were collected. The evaluation of SOD2 expression by immunohistochemistry assay was based on the percentage of stained cells and the staining intensity, analyzed separately and together by a score. The analyses of the percentage of stained cells was performed using three cut points (50%, 75% and 90% of stained cells), and each cut point generating a specific score, categorized as high and low.

Results: The intensity of staining and the percentage of cells stained for any cut-off point are associated with recurrence. Cases with more than 90% stained cells was also associated with death. High 90% score was associated with recurrence, systemic metastases, and death. Disease-free survival and overall survival were worse in women whose carcinoma had more than 90% stained cells and those with high 75% score and 90% score.

Conclusion: The high expression of SOD2 protein, based on the strong intensity and high percentage of stained cells, is a relevant worse prognostic factor for squamous cell carcinoma of the cervix IIIB.

Key-words: Biomarkers Tumor, Superoxide Dismutase, Uterine Cervical Neoplasms, Survival Analysis, Prognosis.

Introduction

Cervical cancer is a very common malignant neoplastic disease, treatable even when it is advanced at the time of diagnosis, and more than 500.000 new cases have diagnosed each year worldwide.¹ The development of clinical tools for diagnosis, treatment and for follow-up support of malignant neoplasms may qualify the outcome, benefiting the patients.

The protein SOD2 is part of the family of metalloenzymes acting in the antioxidant cell system by catalyzing the conversion of the superoxide (O_2^-) anion into hydrogen peroxide (H_2O_2) in a process known as dismutase.² These two molecules are part of a group known as reactive oxygen species (ROS), which encompasses several molecules that contain oxygen and receive an extra electron, derived from intracellular metabolism, which allows them to oxidize other cells.^{3,4} In eukaryotic cells, metabolic processes are responsible for the generation of ROS, among which mitochondrial respiration is the main source of ROS, which produces O_2^- .^{3,5} The H_2O_2 , the product of dismutation, is a more stable ROS than O_2^- and can be further metabolized by other enzymes such as catalase, for example.⁶ Nevertheless, it is able to rapidly produce functional oxidative modifications.⁷ Thus, the role of SOD2 would be in reducing oxidative stress preventing possible damage to DNA and, consequently, the development of cancer.

In mammals, three distinct isoforms of superoxide dismutase, SOD1 (cytoplasmic), SOD2 (mitochondrial) and SOD3 (extracellular) have been identified and characterized. However, among the three, the only evidence that is essential for the survival of aerobic organisms is SOD2,^{8,9} also known as Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD), is encoded by the SOD2 gene located on the chromosome 6q25.3.^{2,8,10}

The HPV 16 and 18 infections play the highest risk for cervical cancer development, but the expression of SOD2 seems to play an independent role of HPV type risk.¹¹ Also it is well known that SOD2 protein is differentially expressed according to the lesion severity of the cervical epithelial neoplasia.^{11,12} However, the possible association of SOD2 expression with the prognosis of this neoplasm is still unknown. The aim of this study was to evaluate whether SOD2 protein expression is associated with the prognosis of cervical carcinoma stage IIIB.

Methodology

Selection of cases

This study selected patients from a cohort consisting of tumor samples from women included in the prospective clinical trial entitled as “Concomitant cisplatin plus radiotherapy and high-dose-rate brachytherapy versus radiotherapy alone for stage IIIB epidermoid cervical cancer: a randomized controlled trial”, conducted at the Women's Hospital Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti, State University of Campinas (UNICAMP), Brazil, approved by the local Research Ethics Committee (Protocol No. 2.426.854). Briefly, from September 2003 to July 2010, the clinical trial included women with stage IIIB cervical squamous cell carcinoma, creatinine clearance higher than 60 mL/min/1.73 m², normal liver enzymes, Karnofsky score higher than 70%, baseline hemoglobin levels ≥ 10 mg/dL. Of the 147 women included, 72 received cisplatin concomitantly with radiotherapy (CRT) and 75 women received radiotherapy alone (RT) and were followed-up to seven years. Overall, all women received teletherapy with a dose of 45Gy for the pelvic region in 25 fractions, 14.4Gy of reinforcement in the compromised parametries, and high dose rate brachytherapy in four weekly fractions of 7Gy, prescribed in section A. Women in the CRT group also received weekly chemotherapy with cisplatin (40mg/m²) concomitant with teletherapy. Response to treatment was assessed one month after its completion. The follow-up of treated women was performed every four months in the two years following the treatment, every six months in the third year and thereafter once a year, and the follow-up period lasted until June 2013.¹³

Of the 147 women included in that clinical trial, 49 had no formalin-fixed paraffin embedded tissue sufficient for additional immunohistochemical assays and 35 women had no paraffin embedded tissue because they had the diagnostic biopsies in other health clinics. Thus, after a careful search, the sample of this study consisted of 63 women. The available samples were again cut and stained with hematoxylin and eosin (HE) to verify the corresponding tissue and the quality of the tumor component. The immunohistochemical assay did not work in eight women and therefore the analyzes were performed in 55 women, being 28 women of the CRT group and 27 of the RT group.

Immunohistochemistry assay for SOD2 detection

The immunohistochemical assays were performed in Cancer Innovation Laboratory, Centro de Investigação Translacional em Oncologia, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo Octavio Frias de Oliveira – ICESP, Universidade de São Paulo, Brazil,

by automated reaction using the UltraView Universal DAB Detection Kit® (Ventana Medical Systems, Inc., Roche, Tucson, Arizona) using the equipment Ventana BenchMark GX (Roche Diagnostics, Mannheim Germany), according the manufacturer instructions. For the detection of the target proteins, rabbit polyclonal antibodies directed against SOD2 protein (ab 13533, Abcam, Cambridge, USA), in the concentration of 1:1000.

Analyses of Immunohistochemical reaction

The immunohistochemical positivity reaction was evaluated by an experienced pathologist taking into account the intensity of staining and the percentage of stained cells in the representative areas of squamous cell carcinoma. The staining intensity was classified as: 1 (weak); 2 (moderate); 3 (strong). The percentages of positively stained tumor cells were analyzed as dichotomous categorical variable for three cut-off points and: 50% cut-off, classified as: 1 (less than 50% stained tumor cells) and 2 (more than 50% stained tumor cells); 75% cut-off, classified as: 1 (less than 75% stained tumor cells) and 2 (more than 75% stained tumor cells); 90% cut-off, classified as: 1 (less than 90% stained tumor cells) and 2 (more than 90% stained tumor cells). Figure 1 illustrates immunohistochemical assays with different SOD2 expression features.

After that, a score was built for each cut-off point, multiplying the intensity value of the staining by the percentage of stained cells as dichotomous categorical variables, and labeled as “50% score”, “75% score” and “90% score”. To classify the three scores as dichotomous categorical variables, the Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were built taking as outcomes disease recurrence and death, that indicated the five as the best discriminating score value. Therefore the scores were classified in low (<5) and high (>5) for analyses purpose.

Statistical analysis

Frequency tables were made to describe the characteristics of the sample. The comparison of the categorical variables between groups was performed using Chi-Square or Fisher's exact tests. The comparison of numerical variables between groups was performed using the Mann-Whitney test, due to the absence of normal distribution of the variables. The analyzes of the disease-free survival and overall survival curves were performed using the Kaplan-Meier method and the log-rank test. Factors associated with the survivals were

analyzed by Cox Proportional Hazards Regression. The significance level adopted was $p < 0.05$.

Results

The mean age of the patients was 53.9 years (24.0-76.0), the mean duration of treatment was 91 days (58-184) and the mean follow-up time was 45.8 months (5.4 - 90.9). Treatment duration was similar for women treated with RT alone and those with CRT (non-statistically significant difference). Figure 2 shows that 29%, 42% and 58% of the tumors presented, respectively, more than 90%, 75% and 50% of cells stained by immunohistochemistry for SOD2. Still, 29%, 49% and 22% of the tumors presented, respectively, strong, moderate and weak staining intensity.

Table 1 shows SOD2 protein expression according to patient's age, tumor grade, treatment performed and toxicity. There were no statistically significant associations between the analyzed variables and staining intensity, nor with any cut-off point of the percentages of stained cells. There were also no statistically significant associations when the respective scores were tested.

Table 2 shows SOD2 protein expression in relation to disease recurrence and death. It was observed that 62.5% of the patients whose carcinomas showed strong staining had recurrence, which was observed in 33.3% for the carcinomas with weak or moderate staining, difference that was statistically significant ($p = 0.046$). Evaluating the percentage of stained cells with cut-off values in 50% and 75%, no statistically significant difference was observed for recurrence and death. However, 75% of the patients with tumors showing more than 90% of stained cells had recurrence ($p = 0.001$) and 62.5% died ($p = 0.029$), whereas among the patients who had tumors showing less than 90% of stained cells, 28.2% had recurrence and 30.8% died. In the analysis of the scores, statistically significant differences were found for relapse and death considering the analysis of 75% stained cells. For 75% score, 75% of patients who had high score presented recurrence, while the same outcome was observed in 32.6% of the patients with low score ($p = 0.008$); 66.7% of patients who had a high score died, which occurred in 32.6% of the patients who had low score ($p = 0.047$). For 90% score analysis, 90% of the patients who had high score presented recurrence, while the same outcome was observed in only 31.1% of the patients with low score ($p < 0.001$); 80% of the patients who had high score died, which occurred in 31.1% of the patients who presented

low score ($p = 0.01$); in addition, high score was also associated with systemic relapse ($p = 0.045$).

Table 3 shows Cox regression results for analysis of disease-free survival (recurrence) and overall survival (death). Based on univariate analysis, the 50% and 75% cut-off of stained cells did not reveal any difference statistically significant; on the other hand, when samples presented 90% or more of stained cells, the patients showed higher risk for recurrence (HR = 4.28, 95% CI = 1.82-10.06) and for death (HR = 4.06; 95% CI = 1.62-10.22). Patients with high 75% score and high 90% score showed higher risk of recurrence, respectively, HR = 3.09 (95% CI = 1.31-7.31) and HR = 4, 60 (95% CI = 1.91-11.06); similar findings were observed for death, respectively, with HR = 3.16 (95% CI = 1.28-7.78) and HR = 5.00 (95% CI = 1.96-12.76). Based on multivariate analysis, only the 90% score presented statistically significant findings; patients whose tumors had a high 90% score presented higher risks for recurrence (HR = 4.60, 95% CI = 1.91-11.06) and for death (HR = 5.00; 95% CI = 1.96-12.76) than patients who had a low 90% score.

Figure 3 shows the Kaplan-Meier curves for disease-free survival. According to the Log-rank test, the women who presented lower disease-free survival were those whose carcinoma had more than 90% of stained cells (figure 3F) ($p < 0.001$) and those with a high 75% score (figure 3E) ($p = 0.007$) and high 90% score (figure 3G) ($p < 0.001$).

Figure 4 shows the Kaplan-Meier curves for overall survival. According to the log-rank test, the women who presented lower overall survival were those whose carcinoma had more than 90% of stained cells (figure 4F) ($p < 0.001$) and those with a high 75% score (figure 4E) ($p = 0.008$) and high 90% score (figure 4G) ($p < 0.001$).

Discussion

According to the results of this study, high expression of the SOD2 protein is significantly associated with worse prognosis for squamous cell carcinoma of the cervical stage IIIB. In the multivariate analysis, the risk for disease-free survival is observed in samples that presented concomitant occurrence of strong staining intensity and the percentage of stained cells greater than 90% had HR (95% CI) = 4.60 (1.91-11.06). Similar results were obtained for overall survival, which showed HR (95% CI) = 5.0 (1.96-12.76). In the corresponding univariate analyzes it was also observed that the concomitant occurrence of strong staining intensity and percentage of stained cells greater than 75% was associated with disease-free survival and overall survival.

These differences in survival rates for patients whose tumor had a strong staining intensity and more than 90% stained cells were clinically very relevant (high 90% score), since no woman was free of disease after three years of follow-up and overall survival was 12.0% after 4 years of follow-up (there is no information on these patients thereafter). For tumors with low 90% score, disease-free survival was 64.1% and overall survival was 55.9%, both after seven years of follow-up.

The strong staining intensity in immunohistochemistry, regardless of extension, was associated with recurrence of the disease. Tumors presenting 90% or more of stained cells were associated with recurrence and death. The scores based on staining intensity and percentages of stained cells (50%, 75% and 90%) allowed demonstrating that as higher SOD2 expression is, worse the patient's prognosis is.

To date, evidence indicates that SOD2 expression in neoplastic lesions of the cervical epithelium increases with the severity of the disease.^{11,12} Moreover, the main cause of cervical cancer development is persistent high-risk HPV infection, with HPV 16 and 18 being the most at risk, but there is evidence that SOD2 expression would play a role in the carcinogenesis of cervical epithelium independent of the type of HPV.¹¹ In summary, SOD2 protein expression level seems to play a crucial role in cervical carcinogenesis. High SOD2 levels are associated not only to the severity of cervical disease but also with worse prognosis.

Studies conducted *in vitro* tend to demonstrate a protective role against the malignant phenotype. High expression of members of the SOD family is related to increased cell differentiation, decreased cell growth and proliferation, and reversion of the malignant phenotype to a non-malignant phenotype.¹⁴ The SOD2 expression in transformed cell lines seems to have a protective function.¹⁵⁻¹⁷

In vivo studies converge to the association of the high expression of SOD2 with more aggressive tumor phenotypes. Generally, in the early stages, the expression of SOD2 found is lower, indicating that the low level of SOD2 could be associated with the onset of tumor development due to damage to DNA and cells. In this way, the low levels of antioxidants lead to an increase in the accumulation of ROS and consequent carcinogenesis. In contrast, in advanced stage tumors, SOD2 levels are commonly increased, especially in metastatic tumors.^{3,8} This might occur because the tumor cells metabolism is aberrant, accumulating an excessive amount of ROS, which would induce cellular damage that may promote tumor development, as well as its malignant phenotype. Thus, in order to prevent cellular damage, the antioxidant system would be activated, thus increasing the expression of SOD2.

Most studies on SOD2 expression and cancer showed that the high expression of this protein is associated with the presence of metastasis and a poor prognosis in many malignancies, corroborating with the results of this study. Taking frozen biopsy specimens of lung, colon and prostate tissues, SOD2 was expressed in higher amounts during tumor progression when compared to its controls.¹⁸ SOD2 expression was also increased in samples of esophageal tumor tissue, compared to tissues without the neoplasia. In addition, the mean overall survival of patients who had high SOD2 expression was lower than that of patients who had low expression.¹⁹ Results that reinforced the association of SOD2 with poor prognosis were also found in lymphoma,^{20,21} glioblastoma,²² bladder,²³ colorectal,²⁴ oral cancer,²⁵ lung.²⁶

Although the sample size was small, this study showed an evident association of SOD2 expression with the prognosis of cervical cancer, which occurs only when the actual differences are very evident. It should also be noted that this study included patients who were treated and followed-up in the same institution, presenting homogeneity of cases with the same stage and histological type. In addition, the selection of women involved cases of advanced carcinomas, that is, with high probability of recurrence and death, and therefore sensitive for prognostic analysis. Nevertheless the small sample size was a fragility because it did not allow to test the prognostic association in intermediate situations of SOD2 expression. Also, this study did not provide any information for earlier invasive cervical cancer, which would allow a better characterization of the pattern of prognostic association.

In conclusion, this study showed that the high expression of the SOD2 protein is clearly associated with worse prognosis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix IIIB. SOD2 protein expression could be considered a candidate as biological marker for clinical approaches of women with cervical carcinoma. These findings, together with the available evidences in the literature, suggest that the oxidative system and especially the SOD2 protein could be considered as therapeutic target for malignant neoplasms.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359–86.
2. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med* 2005;26:340–52.

3. Che M, Wang R, Wang H-Y, Zheng XFS. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov Today* 2016;21:143–9.
4. Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab* 2014;2:1–12.
5. Rodic S, Vincent MD. Reactive oxygen species (ROS) are a key determinant of cancer's metabolic phenotype. *Int J Cancer* 2017;142:440–8.
6. Hempel, N., Carrico, P.M., Melendez JA. Manganese superoxide dismutase (Sod2) and redox-control of signaling events that drive metastasis. 2011;11:191–201.
7. Zou X, Ratti BA, O'Brien JG, Lautenschlager SO, Gius DR, Bonini MG, Zhu Y. Manganese superoxide dismutase (SOD2): is there a center in the universe of mitochondrial redox signaling? *J Bioenerg Biomembr* 2017;49:325–33.
8. Miao L, St. Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radic Biol Med* 2009;47:344–56.
9. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 1995;11:376–81.
10. Beck Y, Oren R, Amit B, Levanon A, Gorecki M, Hartman JR. Human Mn superoxide dismutase cDNA sequence. *Nucleic Acids Res* 1987;15:9076.
11. Rabelo-Santos SH, Termini L, Boccardo E, Derchain S, Longatto-Filho A, Andreoli MA, Costa MC, Nunes RAL, Ângelo-andrade LAL, Villa LL, Almeida R, Nunes L, et al. Strong SOD2 expression and HPV-16/18 positivity are independent events in cervical cancer. *Oncotarget* 2018;9:21630–40.
12. Termini L, Filho AL, MacIag PC, Etlinger D, Alves VAF, Nonogaki S, Soares FA, Villa LL. Deregulated expression of superoxide dismutase-2 correlates with different stages of cervical neoplasia. *Dis Markers* 2011;30:275–81.
13. Zuliani AC, Esteves SCB, Teixeira LC, Teixeira JC, De Souza GA, Sarian LO. Concomitant cisplatin plus radiotherapy and high-dose-rate brachytherapy versus radiotherapy alone for stage IIIB epidermoid cervical cancer: A randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2014;32:542–7.
14. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med* 2004;36:718–44.

15. Church SL, Grant JW, Ridnour LA, Oberley LW, Swanson PE, Meltzer PS, Trent JM. Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:3113–7.
16. Liu RG, Oberley TD, Oberley LW. Transfection and expression of MnSOD cDNA decreases tumor malignancy of human oral squamous carcinoma SCC-25 cells. *Hum Gene Ther* 1997;8:585–95.
17. Ough M, Lewis A, Zhang YP, Hinkhouse MM, Ritchie JM, Oberley LW, Cullen JJ. Inhibition of cell growth by overexpression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in human pancreatic carcinoma. *Free Radic Res* 2004;38:1223–33.
18. Miar A, Hevia D, Muñoz-Cimadevilla H, Astudillo A, Velasco J, Sainz RM, Mayo JC. Manganese superoxide dismutase (SOD2/MnSOD)/catalase and SOD2/GPx1 ratios as biomarkers for tumor progression and metastasis in prostate, colon, and lung cancer. *Free Radic Biol Med* 2015;85:45–55.
19. Ma RL, Shen LY, Chen KN. Coexpression of ANXA2, SOD2 and HOXA13 predicts poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2014;31:2157–64.
20. Karihtala P, Porvari K, Soini Y, Haapasaari KM. Redox Regulating Enzymes and Connected MicroRNA Regulators Have Prognostic Value in Classical Hodgkin Lymphomas. *Oxid Med Cell Longev* 2017;1–8.
21. Bur H, Haapasaari KM, Turpeenniemi-Hujanen T, Kuittinen O, Auvinen P, Marin K, Koivunen P, Sormunen R, Soini Y, Karihtala P. Oxidative stress markers and mitochondrial antioxidant enzyme expression are increased in aggressive Hodgkin lymphomas. *Histopathology* 2014;65:319–27.
22. Shwetha SD, Shastry AH, Arivazhagan A, Santosh V. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) is a malignant astrocytoma specific biomarker and associated with adverse prognosis in p53 expressing glioblastoma. *Pathol Res Pract* 2016;212:17–23.
23. Wieczorek E, Jablonowski Z, Tomasik B, Gromadzinska J, Jablonska E, Konecki T, Fendler W, Sosnowski M, Wasowicz W, Reszka E. Different gene expression and activity pattern of antioxidant enzymes in bladder cancer. *Anticancer Res* 2017;37:841–8.
24. Toh Y, Kuninaka S, Oshiro T, Ikeda Y, Nakashima H, Baba H, Kohnoe S, Okamura T, Mori M, Sugimachi K. Overexpression of manganese superoxide dismutase mRNA may correlate with aggressiveness in gastric and colorectal adenocarcinomas. *Int J Oncol* 2000;17:107–12.

25. Wang W, He Q, Sun J, Liu Z, Zhao L, Lu Z, Zhou X, Wang A. Pyruvate kinase M2 deregulation enhances the metastatic potential of tongue squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2017;8:68252–62.
26. Chen P-M, Wu T-C, Shieh S-H, Wu Y-H, Li M-C, Sheu G-T, Cheng Y-W, Chen C-Y, Lee H. MnSOD Promotes Tumor Invasion via Upregulation of FoxM1-MMP2 Axis and Related with Poor Survival and Relapse in Lung Adenocarcinomas. *Mol Cancer Res* 2013;11:261–71.

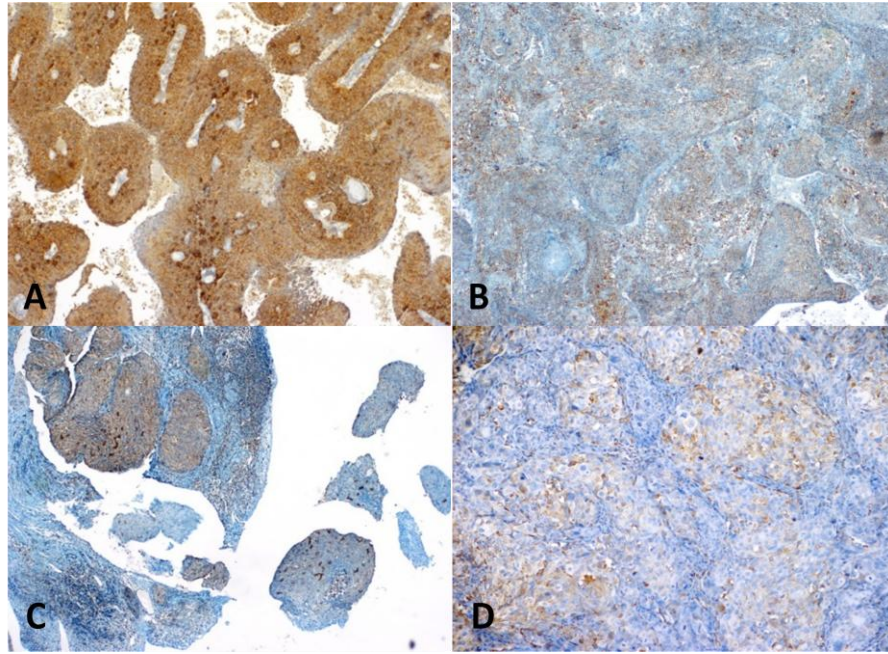


Figure 1: Immunohistochemical analysis of SOD2 expression in squamous cell carcinoma of the cervix. Expression cytoplasmic, granulated-like in: **(A)** More than 90% of stained cells (4x). Strong staining intensity (intensity 3). **(B)** More than 75% but less than 90% of stained cells (4x). Weak staining intensity (intensity 1). **(C)** More than 50% but less than 75% of stained cells (4x). Moderate staining intensity (intensity 2). **(D)** Less than 50% of stained cells (4x). Moderate staining intensity (intensity 2).

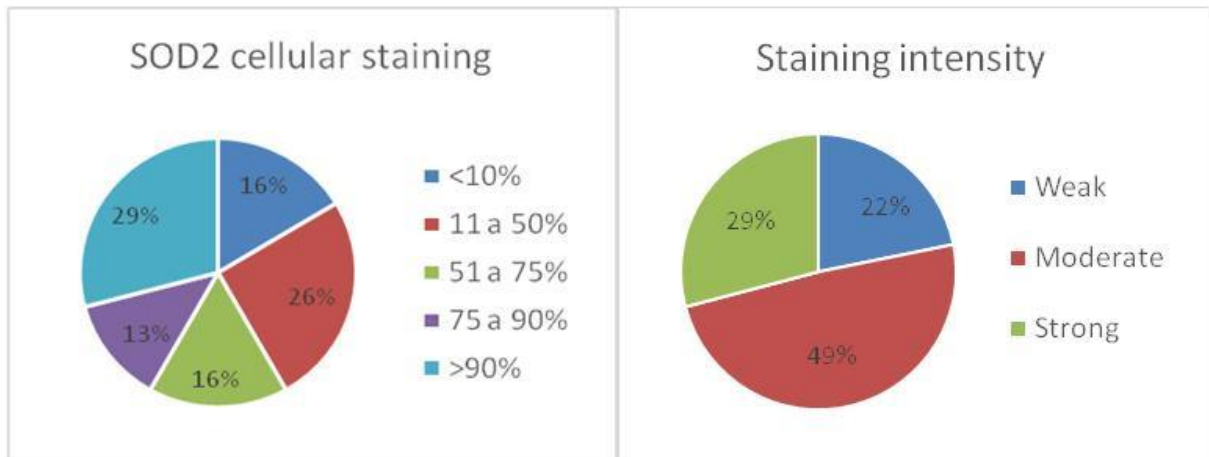


Figure 2: Distribution of patients according stained cells and staining intensity for SOD2 protein.

Table 1. Expression of SOD2 protein according to patient's age, tumor grade, treatment performed and toxicity

	n	Staining intensity			SOD2 cellular staining [#]			Score ^λ 50% stained cells		
		Weak/ Moderate	Strong	<i>p</i>	< 50%	≥ 50%	<i>p</i>	Low	High	<i>p</i>
Age										
<50	15	23,1	37,5		17,4	34,4		24,4	35,7	
50-59	20	38,5	31,3	0,55 ^a	43,5	31,3	0,36 ^a	39,0	28,6	0,67 ^a
≥60	20	38,5	31,3		39,1	34,4		36,6	35,7	
Tumor grade*										
1	3	5,3	6,3		4,6	6,3		5,0	7,1	
2	42	79,0	75,0	1,00 ^β	81,8	75,0	0,88 ^β	77,5	78,6	1,00 ^β
3	9	15,8	18,8		13,6	18,8		17,5	14,3	
Treatment										
CRT	28	53,9	43,8		60,9	43,8		56,1	35,7	
RT	27	46,2	56,3	0,50 ^a	39,1	56,3	0,21 ^a	43,9	64,3	0,19 ^a
Acute Toxicity*										
Yes	15	30,6	26,7		25,0	32,3		31,6	23,1	
No	36	69,4	73,3	1,00 ^β	75,0	67,7	0,58 ^a	68,4	76,9	0,73 ^β
Late Toxicity*										
Yes	23	46,2	33,3		31,8	50,0		45,0	35,7	
No	31	53,9	66,7	0,39 ^a	68,2	50,0	0,18 ^a	55,0	64,3	0,54 ^a
n		39	16		23	32		41	14	

CRT = Chemoradiotherapy. RT= Radiotherapy

* Some cases had no available information of tumor grade, acute toxicity and late toxicity, therefore cases with this information available were presented.

[#] Analyzes between the percentage of cells stained with age, tumor grade, treatment, acute toxicity and late toxicity showed no statistically significant association also for cut points in 75% and 90% stained cells.

^λScores were calculated multiplying the percentage of stained cells by staining intensity to each cut point and categorized as low and high.

^a Chi-squared test. ^β Fisher's exact test.

Table 2. Expression of SOD2 protein according to the occurrence of relapse, local recurrence, regional recurrence, distant recurrence and death.

	n	Staining Intensity			SOD2 cellular staining			Score ^λ 50% stained cells			SOD2 cellular staining			Score ^λ 75% stained cells			SOD2 cellular staining			Score ^λ 90% stained cells		
		Weak/ Moderate	Strong	p	<50%	≥50%	p	Low	High	p	<75%	≥75%	p	Low	High	p	<90%	≥90%	p	Low	High	p
Relapse																						
Yes	23	33,3	62,5	0,046 ^α	30,4	50,0	0,15 ^α	34,1	64,3	0,048 ^α	34,4	52,2	0,19 ^α	32,6	75,0	0,008 ^α	28,2	75,0	0,001 ^α	31,1	90,0	<0,001 ^β
No	32	66,7	37,5		69,6	50,0		65,9	35,7		65,6	47,8		67,4	25,0		71,8	25,0		68,9	10,0	
Local recurrence																						
Yes	11	20,5	18,8	1,00 ^β	21,7	18,8	1,00 ^β	19,5	21,4	1,00 ^β	18,8	21,7	1,00 ^β	18,6	25,0	0,689 ^β	15,4	31,3	0,266 ^β	17,8	30,0	0,4 ^β
No	44	79,5	81,3		78,3	81,3		80,5	78,6		81,2	78,3		81,4	75,0		84,6	68,7		82,2	70,0	
Regional recurrence																						
Yes	10	12,8	31,3	0,134 ^β	21,7	15,6	0,73 ^β	14,6	28,6	0,255 ^β	12,5	26,1	0,29 ^β	14,0	33,3	0,199 ^β	12,8	31,3	0,134 ^β	13,3	40,0	0,07 ^β
No	45	87,2	68,8		78,3	84,4		85,4	71,4		87,5	73,9		86,0	66,7		87,2	68,7		86,7	60,0	
Distant recurrence																						
Yes	13	18,0	37,5	0,165 ^β	17,4	28,1	0,35 ^α	19,5	35,7	0,279 ^β	21,9	26,1	0,72 ^α	18,6	41,7	0,129 ^β	18,0	37,5	0,165 ^β	17,8	50,0	0,045 ^β
No	42	82,0	62,5		82,6	71,9		80,5	64,3		78,1	73,9		81,4	58,3		82,0	62,5		82,2	50,0	
Death																						
Yes	22	33,3	56,2	0,115 ^α	30,4	46,9	0,22 ^α	34,1	57,1	0,129 ^α	34,4	47,8	0,31 ^α	32,6	66,7	0,047 ^β	30,8	62,5	0,029 ^α	31,1	80,0	0,01 ^β
No	33	66,7	43,8		69,6	53,1		65,9	42,9		65,6	52,2		67,4	33,3		69,2	37,5		68,9	20,0	
n		39	16		23	32		41	14		32	23		43	12		39	16		45	10	

^λScores were calculated multiplying the percentage of stained cells by staining intensity to each cut point and categorized as low and high.

^αChi-squared test. ^βFisher's exact test.

Table 3: Univariate and multivariate Cox regression analysis for disease-free survival and overall survival according to patient's age and tumor grade and SOD2 expression* (n = 55)

Univariate Analysis	Categories	DFS		OS	
		HR [#]	95% CI [#]	HR ^{##}	95% CI ^{##}
Age	<50	2,34	0,81 - 6,79	3,88	1,16 - 12,97
	50-59	1,00	-	1,00	-
	≥60	1,66	0,59 - 4,68	2,67	0,84 - 8,51
Tumor grade*	1 e 2	1,00	-	1,00	-
	3	1,14	0,39 - 3,36	1,17	0,39 - 3,47
Staining intensity	Weak/Moderate	1,00	-	1,00	-
	Strong	2,20	0,95 - 5,06	2,16	0,91 - 5,11
50% stained cells	<50%	1,00	-	1,00	-
	≥50%	1,82	0,75 - 4,42	1,80	0,73 - 4,45
75% stained cells	<75%	1,00	-	1,00	-
	≥75%	1,81	0,79 - 4,15	1,84	0,78 - 4,36
90% stained cells	<90%	1,00	-	1,00	-
	≥90%	4,28	1,82 - 10,06	4,06	1,62 - 10,22
<i>Score</i> ^λ 50% stained cells	Low	1,00	-	1,00	-
	High	2,21	0,95 - 5,15	2,14	0,89 - 5,15
<i>Score</i> ^λ 75% stained cells	Low	1,00	-	1,00	-
	High	3,09	1,31 - 7,31	3,16	1,28 - 7,78
<i>Score</i> ^λ 90% stained cells	Low	1,00	-	1,00	-
	High	4,60	1,91 - 11,06	5,00	1,96 - 12,76
Multivariate Analysis					
<i>Score</i> 90% ^λ stained cells	Low	1,00	-	1,00	-
	High	4,60	1,91 - 11,06	5,00	1,96 - 12,76

DFS = Disease-free survival. OS= Overall survival.

* The evaluation of SOD2 expression was based on the percentage of stained cells and the staining intensity, analyzed separately and together by a *Score*^λ.

^λ*Scores* were calculated multiplying the percentage of stained cells by staining intensity to each cut point and categorized as low and high.

[#]HR (Hazard Ratio) = Hazard Ratio to relapse; censored= 32 patients; relapse= 23 patients.

^{##}HR (Hazard Ratio) = Hazard Ratio to death; censored= 33 patients; death= 22 patients.

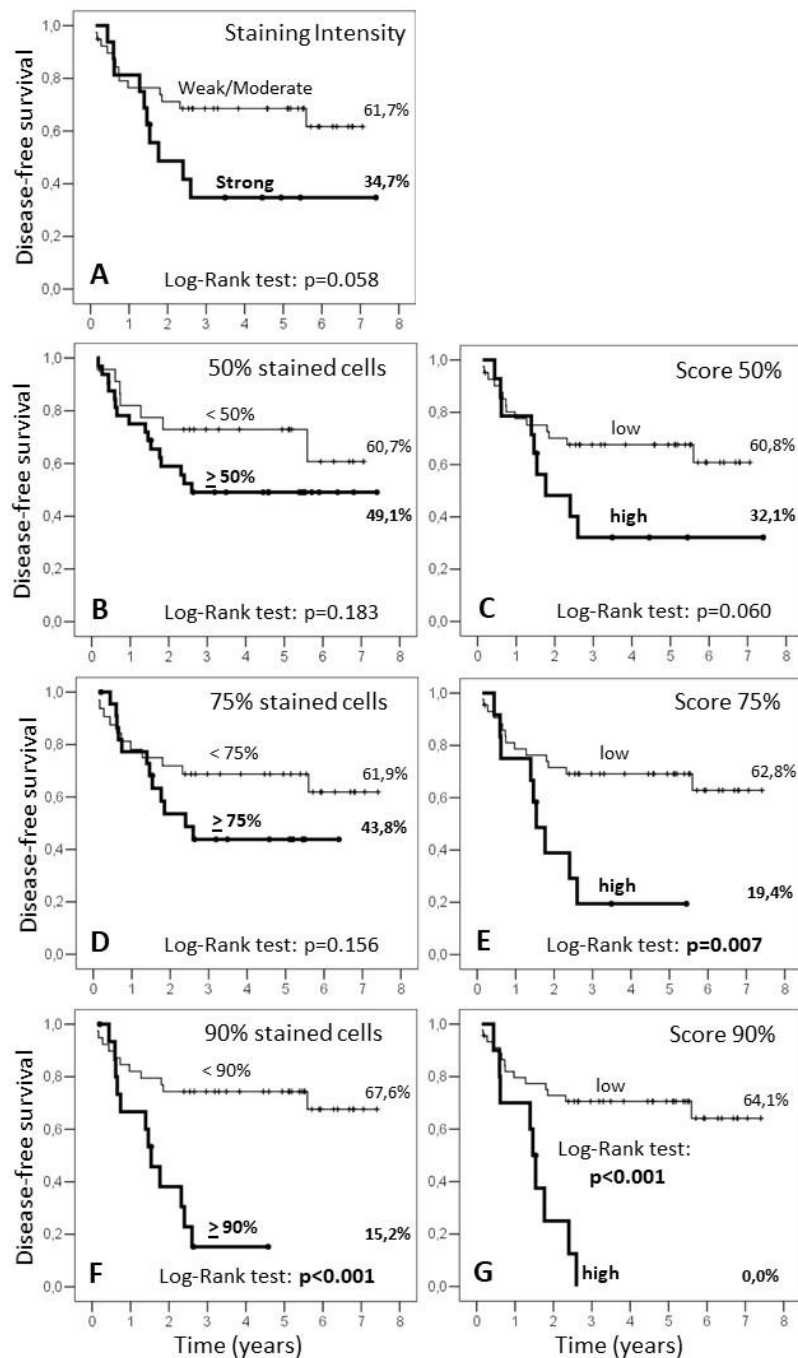


Figure 3: Disease-free survival according to SOD2 expression (years) **A**: Staining intensity. **B**: Cut-off point in 50% of stained cells. **C**: Score^λ 50% stained cells; calculated by multiplying the percentage of stained cells with cut-off point in 50% by staining intensity and categorized as low and high. **D**: Cut-off point in 75% of stained cells. **E**: Score^λ 75% stained cells; calculated by multiplying the percentage of stained cells with cut-off point in 75% by staining intensity and categorized as low and high. **F**: Cut-off point in 90% of stained cells. **G**: Score^λ 90% stained cells; calculated by multiplying the percentage of stained cells with cut-off point in 90% by staining intensity and categorized as low and high.

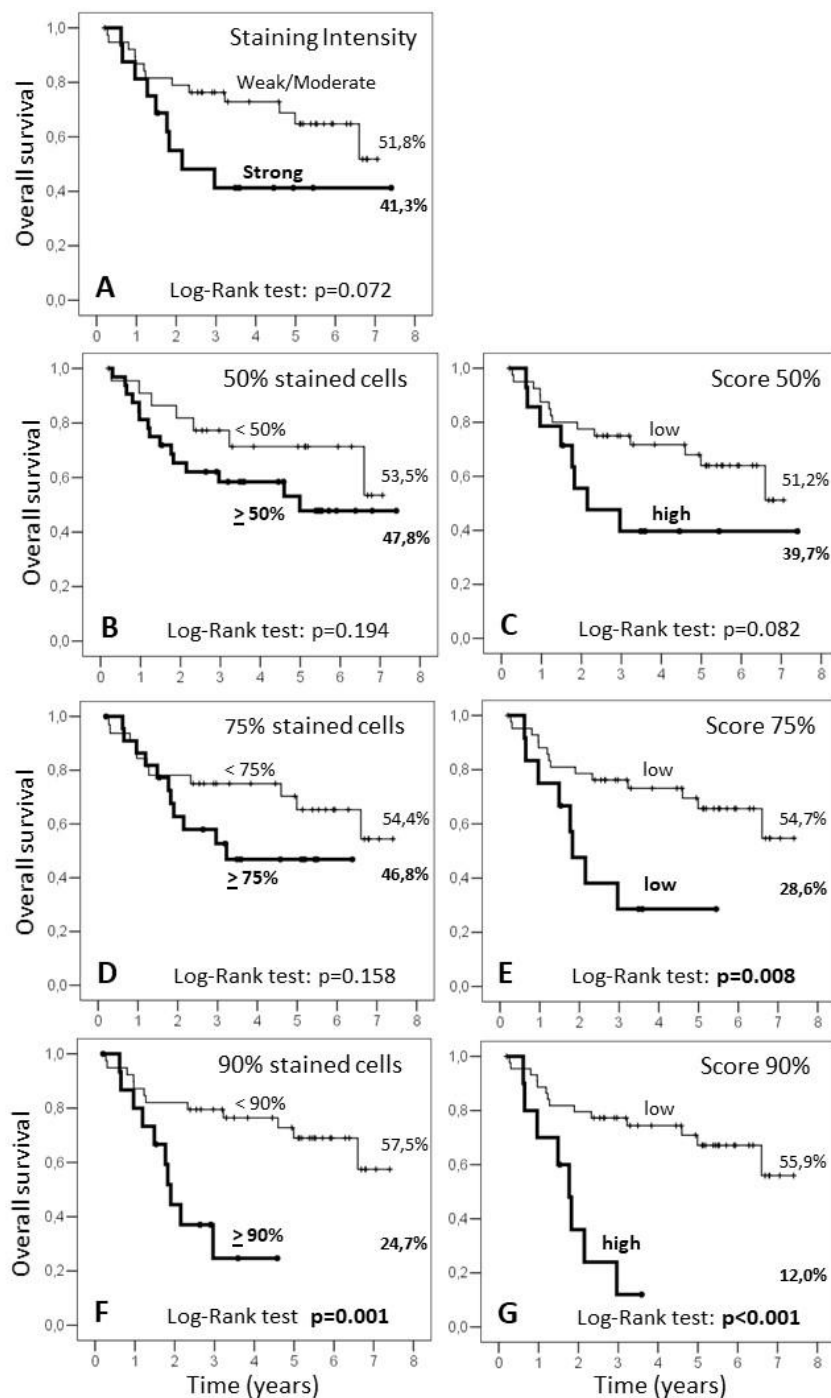


Figure 4: Overall survival according to SOD2 expression (years). **A:** Staining intensity. **B:** Cut-off point in 50% of stained cells. **C:** Score^λ 50% stained cells; calculated by multiplying the percentage of stained cells with cut-off point in 50% by staining intensity and categorized as low and high. **D:** Cut-off point in 75% of stained cells. **E:** Score^λ 75% stained cells; calculated by multiplying the percentage of stained cells with cut-off point in 75% by staining intensity and categorized as low and high. **F:** Cut-off point in 90% of stained cells. **G:** Score^λ 90% stained cells; calculated by multiplying the percentage of stained cells with cut-off point in 90% by staining intensity and categorized as low and high.

5. CONCLUSÃO

- Os tumores de 29% das mulheres tiveram mais de 90% de células coradas; os tumores de 42% das mulheres tiveram mais de 75% de células coradas; os tumores de 58% das mulheres tiveram mais de 50% de células coradas; 29% das mulheres tiveram forte intensidade da coloração em seus tumores.
- Há relação entre a expressão da proteína SOD2, a recorrência do carcinoma do colo do útero estágio IIIB.
- Há relação entre a expressão da proteína SOD2, a com a sobrevida global das mulheres com carcinoma do colo do útero estágio IIIB.

6. REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. [cited 2018 Jun 28]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
2. INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2017;1–128.
3. INCA. Colo do Útero [Internet]. [cited 2018 Feb 3]. Available from: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio
4. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, et al. Persistent Human Papillomavirus Infection as a Predictor of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Jama*. 2001;286(24):3106–14.
5. McCredie MR, Sharples KJ, Paul C, Baranyai J, Medley G, Jones RW et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2008;9(5):425–34.
6. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007;121(3):621–32.
7. Park B, Kim SI, Seo S-S, Kang S, Park S-Y, Lim MC. Health Behaviors and Associated Sociodemographic Factors in Cervical Cancer Survivors Compared with Matched Non-Cancer Controls. *PLoS One*. 2016;11(8):1–11.
8. Basu P, Mittal S, Bhadra Vale D, Chami Kharaji Y. Secondary prevention of cervical cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. Elsevier Ltd; 2017;1–13.
9. Ponti A, Anttila A, Ronco G, Senore C. Cancer Screening in the European Union (2017) [Internet]. Lyon; 2017 [cited 2018 Feb 3]. Available from: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/major_chronic_diseases/docs/2017_cancerscreening_2ndreportimplementation_en.pdf
10. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. Fourth Edition. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. 2014.

11. Ministério da Saúde. Nota informativa sobre mudanças no calendário nacional de vacinação para o ano de 2017. 2016;10. Available from: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/outubro/20/Nota-Informativa-311-Calendario-Nacional-de-Vacinacao-2017.pdf>
12. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012;30S:F55–70.
13. Lea J, Coleman R, Garner E, Duska L, Miller D, Schorge J. Adenosquamous histology predicts poor outcome in low-risk stage IB1 cervical adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*. 2003;91(3):558–62.
14. Galic V, Herzog TJ, Lewin SN, Neugut AI, Burke WM, Lu YS, et al. Prognostic significance of adenocarcinoma histology in women with cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2012;125:287–91.
15. Committee F. FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and corpus uteri. *Int J Gynecol Obstet* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;125(2):97–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijgo.2014.02.003>
16. Vale DB, Sauvaget C, Muwonge R, Ferlay J, Zeferino LC, Murillo R, et al. Disparities in time trends of cervical cancer mortality rates in Brazil. *Cancer Causes Control*. 2016;27(7):889–96.
17. INCA. Ocorrência_Sobrevida [Internet]. [cited 2018 Feb 3]. Available from: http://www1.inca.gov.br/situacao/arquivos/ocorrencia_sobrevida.pdf
18. Thuler LCS, Aguiar SS de, Bergmann A. Determinantes do diagnóstico em estágio avançado do câncer do colo do útero no Brasil. *Rev Bras Ginecol e Obs*. 2014;36(6):237–43.
19. Bermudez A, Bhatla N, Leung E. Cancer of the cervix uteri. *Int J Gynecol Obstet*. 2015;131:S88–95.
20. Quinn M a, Benedet JL, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Creasman WT, et al. Carcinoma of the cervix uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet*. 2006;95 Suppl 1(26):S43–103.
21. Eralp Y, Saip P, Sakar B, Kucucuk S, Aydiner A, Dincer M, et al. Prognostic factors and survival in patients with metastatic or recurrent carcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer*. 2003;13(4):497–504.

22. Moore DH, Blessing J a, McQuellon RP, Thaler HT, Cella D, Benda J, et al. Phase III study of cisplatin with or without paclitaxel in stage IVB, recurrent, or persistent squamous cell carcinoma of the cervix: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol*. 2004;22(15):3113–9.
23. Elit L, Fyles AW, Devries MC, Oliver TK, Fung-Kee-Fung M. Follow-up for women after treatment for cervical cancer: A systematic review. Vol. 114, *Gynecologic Oncology*. 2009. p. 528–35.
24. Zola P, Macchi C, Cibula D, Colombo N, Kimmig R, Maggino T, et al. Follow-up in gynecological malignancies: A state of art. *Int J Gynecol Cancer*. 2015;25(7):1151–64.
25. Grigsby PW. Radiotherapy for pelvic recurrence after radical hysterectomy for cervical cancer. *Radiat Med*. 2005;23(5):327–30.
26. Haasbeek CJ a, Uitterhoeve ALJ, van der Velden J, González DG, Stalpers LJ a. Long-term results of salvage radiotherapy for the treatment of recurrent cervical carcinoma after prior surgery. *Radiother Oncol*. 2008;89(2):197–204.
27. Piura B, Rabinovich A, Friger M. Recurrent cervical carcinoma after radical hysterectomy and pelvic lymph node dissection: A study of 32 cases. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2008;29(1):31–6.
28. Legge F, Chiantera V, MacChia G, Fagotti A, Fanfani F, Ercoli A, et al. Clinical outcome of recurrent locally advanced cervical cancer (LACC) submitted to primary multimodality therapies. *Gynecol Oncol*. 2015;138:83–8.
29. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? Vol. 5, *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2010. p. 463–6.
30. Termini L, Boccardo E, Esteves GH, Hirata R, Martins WK, Colo AEL, et al. Characterization of global transcription profile of normal and HPV-immortalized keratinocytes and their response to TNF treatment. *BMC Med Genomics*. 2008;1(29):1–17.
31. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med*. 2005;26:340–52.
32. Miller A-F. Superoxide dismutases: Active sites that save, but a protein that kills. *Curr Opin Chem Biol*. 2004;8(2):162–8.

33. Che M, Wang R, Wang H-Y, Zheng XFS. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov Today*. 2016;21(1):143–9.
34. Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab*. 2014;2(17):1–12.
35. Hempel, N., Carrico, P.M., Melendez JA. Manganese superoxide dismutase (Sod2) and redox-control of signaling events that drive metastasis. 2011;11(2):191–201.
36. Zou X, Ratti BA, O'Brien JG, Lautenschlager SO, Gius DR, Bonini MG, et al. Manganese superoxide dismutase (SOD2): is there a center in the universe of mitochondrial redox signaling? *J Bioenerg Biomembr*. 2017;49(4):325–33.
37. Miao L, St. Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radic Biol Med*. 2009;47:344–56.
38. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*. 1995;11(4):376–81.
39. Beck Y, Oren R, Amit B, Levanon A, Gorecki M, Hartman JR. Human Mn superoxide dismutase cDNA sequence. *Nucleic Acids Res*. 1987;15(21):9076.
40. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med*. 2004;36(6):718–44.
41. Church SL, Grant JW, Ridnour LA, Oberley LW, Swanson PE, Meltzer PS, et al. Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(7):3113–7.
42. Liu RG, Oberley TD, Oberley LW. Transfection and expression of MnSOD cDNA decreases tumor malignancy of human oral squamous carcinoma SCC-25 cells. *Hum Gene Ther*. 1997;8(5):585–95.
43. Ough M, Lewis A, Zhang YP, Hinkhouse MM, Ritchie JM, Oberley LW, et al. Inhibition of cell growth by overexpression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in human pancreatic carcinoma. *Free Radic Res*. 2004;38(11):1223–33.

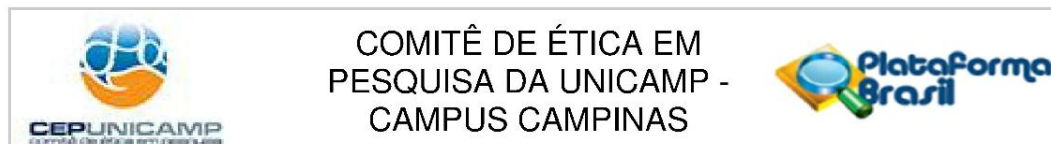
44. Holley AK, Dhar SK, Xu Y, St. Clair DK. Manganese superoxide dismutase: beyond life and death. *Amino Acids*. 2012;42(1):139–58.
45. Rodic S, Vincent MD. Reactive oxygen species (ROS) are a key determinant of cancer's metabolic phenotype. *Int J Cancer*. 2017;142:440–8.
46. Ekoue DN, He C, Diamond AM, Bonini MG. Manganese superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 contribute to the rise and fall of mitochondrial reactive oxygen species which drive oncogenesis. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2017;1858:628–32.
47. Termini L, Fregnani JH, Boccardo E, Da Costa WH, Longatto-Filho A, Andreoli MA, et al. SOD2 immunoexpression predicts lymph node metastasis in penile cancer. *BMC Clin Pathol*. 2015;3:1–8.
48. Ma RL, Shen LY, Chen KN. Coexpression of ANXA2, SOD2 and HOXA13 predicts poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2014;31(5):2157–64.
49. Chen P-M, Wu T-C, Shieh S-H, Wu Y-H, Li M-C, Sheu G-T, et al. MnSOD Promotes Tumor Invasion via Upregulation of FoxM1-MMP2 Axis and Related with Poor Survival and Relapse in Lung Adenocarcinomas. *Mol Cancer Res*. 2013;11(3):261–71.
50. Miar A, Hevia D, Muñoz-Cimadevilla H, Astudillo A, Velasco J, Sainz RM, et al. Manganese superoxide dismutase (SOD2/MnSOD)/catalase and SOD2/GPx1 ratios as biomarkers for tumor progression and metastasis in prostate, colon, and lung cancer. *Free Radic Biol Med*. 2015;85:45–55.
51. Karihtala P, Porvari K, Soini Y, Haapasaari KM. Redox Regulating Enzymes and Connected MicroRNA Regulators Have Prognostic Value in Classical Hodgkin Lymphomas. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;1–8.
52. Bur H, Haapasaari KM, Turpeenniemi-Hujanen T, Kuittinen O, Auvinen P, Marin K, et al. Oxidative stress markers and mitochondrial antioxidant enzyme expression are increased in aggressive Hodgkin lymphomas. *Histopathology*. 2014;65(3):319–27.
53. Shwetha SD, Shastry AH, Arivazhagan A, Santosh V. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) is a malignant astrocytoma specific biomarker and associated with adverse prognosis in p53 expressing glioblastoma. *Pathol Res Pract*. 2016;212(1):17–23.

54. Wieczorek E, Jablonowski Z, Tomasik B, Gromadzinska J, Jablonska E, Konecki T, et al. Different gene expression and activity pattern of antioxidant enzymes in bladder cancer. *Anticancer Res.* 2017;37(2):841–8.
55. Wang W, He Q, Sun J, Liu Z, Zhao L, Lu Z, et al. Pyruvate kinase M2 deregulation enhances the metastatic potential of tongue squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(40):68252–62.
56. Toh Y, Kuninaka S, Oshiro T, Ikeda Y, Nakashima H, Baba H, et al. Overexpression of manganese superoxide dismutase mRNA may correlate with aggressiveness in gastric and colorectal adenocarcinomas. *Int J Oncol.* 2000;17(1):107–12.
57. Termini L, Filho AL, Maclag PC, Etlinger D, Alves VAF, Nonogaki S, et al. Deregulated expression of superoxide dismutase-2 correlates with different stages of cervical neoplasia. *Dis Markers.* 2011;30(6):275–81.
58. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. Vol. 25, *Reviews in Medical Virology.* 2015. p. 2–23.
59. Rabelo-Santos SH, Termini L, Boccardo E, Derchain S, Longatto-Filho A, Andreoli MA, et al. Strong SOD2 expression and HPV-16/18 positivity are independent events in cervical cancer. *Oncotarget.* 2018;9(31):21630–40.
60. Zuliani AC, Esteves SCB, Teixeira LC, Teixeira JC, De Souza GA, Sarian LO. Concomitant cisplatin plus radiotherapy and high-dose-rate brachytherapy versus radiotherapy alone for stage IIIB epidermoid cervical cancer: A randomized controlled trial. *J Clin Oncol.* 2014;32(6):542–7.
61. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* Elsevier Ltd; 2009;45(2):228–47.
62. Cancer terms (disease free survival) [Internet]. [cited 2018 Jan 15]. Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/disease-free-survival>
63. Cancer terms (overall survival) [Internet]. [cited 2018 Jan 15]. Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/search?contains=false&q=overall+survival>

64. Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the radiation therapy oncology group (RTOG) and the european organization for research and treatment of cancer (EORTC). Pergamon Int J Radi ati Oncol Biol Phys. 1995;31(5):1341–6.

7. ANEXOS

Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de biomarcadores associados à severidade das lesões das neoplasias do colo uterino.

Pesquisador: Luiz Carlos Zeferino

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 55014816.5.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Goiás - UFG
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

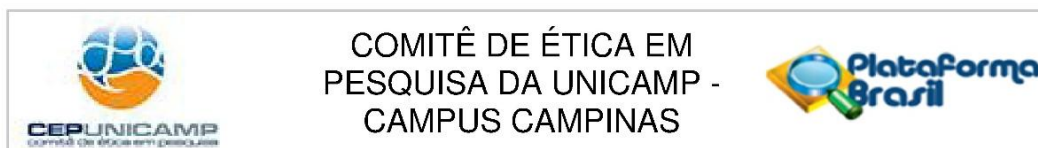
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.647.260

Apresentação do Projeto:

A avaliação de biomarcadores pode ser útil no monitoramento da resposta ao tratamento e na detecção precoce da neoplasia cervical persistente ou recorrente. O conhecimento sobre a associação da expressão de proteínas com a gravidade das lesões do colo do útero poderá contribuir para o melhor entendimento da história natural da infecção e do comportamento biológico da neoplasia cervical, assim como identificar proteínas que poderiam ter um papel como marcador clínico. O objetivo do estudo será analisar a associação entre a expressão das proteínas CSTA, RARRES1, ADAMTS1, CRABP2, LCN2, LXN, PI3(SKALP), SOD2, STAF65 gamma, TRIM31, UROKINASE, VWF, TREX1, RPA1, BRAC1, HMGB1, alfa-manosidase e os tipos de HPV com as lesões precursoras e carcinoma do colo do útero. Este é um estudo retrospectivo do tipo corte transversal será constituído por quatro grupos de 70 mulheres: exame citológico prévio alterado, cuja biópsia não revelou neoplasia; diagnóstico histológico de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) 3; diagnóstico histológico de carcinoma escamoso invasor; diagnóstico histológico de adenocarcinoma. A expressão das proteínas supracitadas será avaliada por imunohistoquímica. A pesquisa do DNA-HPV e sua genotipagem será realizada por reação de cadeia em polimerase utilizando os primers SPF-10 associada a hibridização reversa em pontos. A associação entre duas variáveis categóricas será testada pelo teste de 2 e a magnitude da associação pelo cálculo de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.647.260

odds ratio com respectivos intervalos de confiança a 95%. A interação entre variáveis categóricas será analisada por regressão logística.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a associação entre a expressão das proteínas CSTA, RARRES1, ADAMTS1, CRABP2, LCN2, LXN, PI3(SKALP), SOD2, STAF65 gamma, TRIM31, UROKINASE, VWF, TREX1, RPA1, BRAC1, HMGB1, alfa-manosidase, os tipos de HPV com a neoplasia do colo do útero, escamosa e glandular.

Objetivo adicional desta emenda: avaliar o receptor do Peptídeo Liberador da Gastrina (GRPR) e proteínas diferencialmente expressas em células transduzidas com E6 e E7 de HPV16.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador: Não há riscos. Este é um estudo retrospectivo do tipo corte transversal que analisará mulheres que já foram submetidas ao tratamento e, sendo assim, as análises realizadas neste estudo não implicarão em quaisquer modificações no seguimento clínico da doença e em momento algum gerarão condutas adicionais. Não haverá riscos ou transtornos às pacientes, pois toda a pesquisa será realizada através da revisão de lâminas histológicas e manuseio dos respectivos blocos de parafina. Benefícios: Se ocorrer alguma descoberta que possa modificar positivamente o tratamento e acompanhamento das pacientes, estas poderão ser localizadas e informadas a respeito nos casos em que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP julgar procedentes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma emenda para solicitar autorização para análises imuno-histoquímicas adicionais de material biológico de mulheres que foram incluídas em um estudo anterior aprovado por este CEP, intitulado Identificação de biomarcadores associados à severidade das lesões das neoplasias do colo uterino. Essas análises adicionais consistem em avaliar o receptor do Peptídeo Liberador da Gastrina (GRPR) e proteínas diferencialmente expressas em células transduzidas com E6 e E7 de HPV16.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados adequadamente.

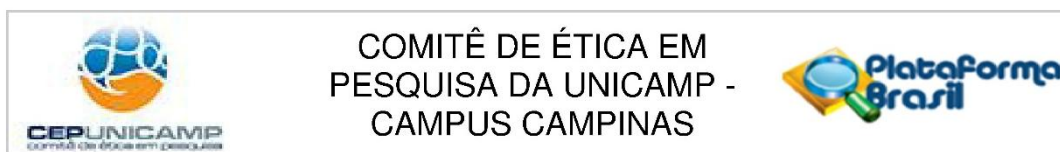
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.647.260

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

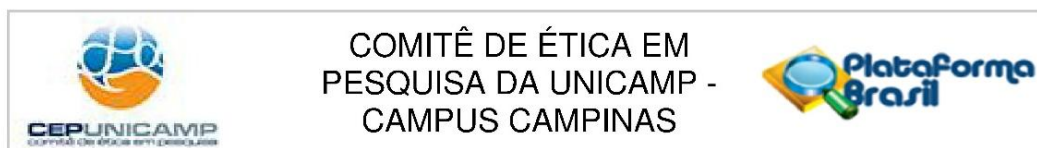
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.647.260

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_691405.pdf	28/06/2016 10:52:12		Aceito
Outros	Adendo.pdf	28/06/2016 10:49:57	Luiz Carlos Zeferino	Aceito
Outros	parecer.pdf	28/06/2016 10:48:39	Luiz Carlos Zeferino	Aceito
Outros	Com_de_pesquisa_CAISM.pdf	08/04/2016 11:59:07	Luiz Carlos Zeferino	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa.pdf	08/04/2016 10:08:37	Luiz Carlos Zeferino	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_do_TCLE.pdf	08/04/2016 10:04:54	Luiz Carlos Zeferino	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	08/04/2016 10:00:56	Luiz Carlos Zeferino	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 25 de Julho de 2016

Assinado por:

**Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)**

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Anexo 2: Aprovação da Emenda do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Identificação de biomarcadores associados à severidade das lesões das neoplasias do colo uterino.

Pesquisador: Luiz Carlos Zeferino

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 55014816.5.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Goiás - UFG
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.426.854

Apresentação do Projeto:

Parecer de apreciação de solicitação de EMENDA 1 (um).

Justificativa da Emenda:

Justificativa em anexo (Adendo_2017). Em anexo referido como adendo apresenta a emenda.

1. Inclusão da análise da expressão da proteína FUS.
- 2- Incluir como variável de análise a sobrevida livre de doença e sobrevida global das pacientes com carcinoma do colo do útero.

As informações sobre recidiva e óbito das pacientes serão obtidas diretamente dos prontuários. Para as análises de sobrevidas, curvas serão construídas pela técnica de Kaplan-Meier e as comparações serão realizadas pelo Teste de log-rank. Modelos de risco proporcional de Cox serão aplicados e os resultados serão expressos em hazard ratio com intervalo de confiança de 95%.

Objetivo da Pesquisa:

Nada é alterado do objetivo do projeto original.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Nada é alterado do objetivo do projeto original.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.426.854

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Haverá uma antecipação na data de inclusão das biopsias; de 2006 para 2003

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para aprovação da presente emenda foram considerados os seguintes documentos:

- PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1009761_E1.pdf 01/12/2017
- Carta_resposta_CEP_2017.pdf 01/12/2017
- Relatório parcial de acompanhamento de pesquisa

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em resposta as pendências do parecer Número: 2.362.859 de 01 de Novembro de 2017 pesquisador declara em Carta_resposta_CEP_2017.pdf 01/12/2017:

Quanto ao cronograma:

"O cronograma foi novamente alterado a fim de adequá-lo aos atrasos sofridos no decorrer do projeto."

A resposta é complementada pela informação que consta no relatório parcial de acompanhamento do projeto enviado por solicitação em 01 de dez 2017 de que ainda não há um financiamento para o projeto e os materiais importados demoraram a chegar. Assim, todo o cronograma do projeto original foi postergado.

Como mencionado o relatório parcial foi encaminhado e faz entender que a coleta de dados de prontuários já foi realizada faltam as análises moleculares, onde essa emenda se encaixa.

Ainda no relatório declara: "O projeto está em fase de adequação e padronização de coletas e métodos a serem utilizados, por isso, ainda não há dados relevantes para publicação."

Considerações Finais a critério do CEP:

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.426.854

previsto ao sujeito participante.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido e enviar notificação ao CEP junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_100976_1_E1.pdf	01/12/2017 16:40:40		Aceito
Outros	Carta_resposta_CEP_2017.pdf	01/12/2017 16:40:00	Luiz Carlos Zeferino	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_biomarcadores_Zeferino_2017.pdf	09/10/2017 15:30:16	Luiz Carlos Zeferino	Aceito
Outros	Adendo_2017.pdf	09/10/2017 15:29:18	Luiz Carlos Zeferino	Aceito
Outros	parecer.pdf	28/06/2016 10:48:39	Luiz Carlos Zeferino	Aceito
Outros	Com_de_pesquisa_CAISM.pdf	08/04/2016 11:59:07	Luiz Carlos Zeferino	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_do_TCLE.pdf	08/04/2016 10:04:54	Luiz Carlos Zeferino	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	08/04/2016 10:00:56	Luiz Carlos Zeferino	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.426.854

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 11 de Dezembro de 2017

Assinado por:
Maria Fernanda Ribeiro Bittar
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Anexo 3: Aprovação do Ensaio Clínico pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-8925

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 16/09/03
(Grupo I)

PARECER PROJETO: N° 238/2003

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “RADIOTERAPIA ASSOCIADA À QUIMIOTERAPIA NO TRATAMENTO DO TUMOR DO COLO UTERINO: ESTUDO PROSPECTIVO RANDOMIZADO”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Antonio Carlos Zuliani de Oliveira

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 02/06/2003

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 16/03/04 e 16/09/04

II - OBJETIVOS

Comparar duas técnicas de tratamento, analisando a taxa de controle local, a sobrevida e a toxicidade ao tratar tumores de colo uterino.

III - SUMÁRIO

Estudo clínico prospectivo randomizado. Serão analisados 200 pacientes divididos em 2 grupos de 100: Grupo A – Radioterapia exclusiva e Grupo B – Radioterapia associada à quimioterapia. A randomização será feita de acordo com a geração, por computador (SAS), de uma seqüência de números de 1 a 200 aleatoriamente.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto apresenta-se bem estruturado, o Termo de Consentimento está adequado.

O pesquisador acatou as sugestões dos relatores e efetuou algumas correções, podendo ser considerado aprovado.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 16 de setembro de 2003.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP