



**MARIANA GENARO BURGER**

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SUPERÓXIDO DESMUTASE 2  
COMO BIOMARCADOR DE NEOPLASIAS DO COLO DO ÚTERO**

***EXPRESSION OF PROTEIN SUPEROXIDE DISMUTASE 2  
AS A BIOMARKER OF CERVICAL CANCER***

**CAMPINAS  
2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Ciências Médicas**

**MARIANA GENARO BURGER**

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SUPERÓXIDO DESMUTASE 2  
COMO BIOMARCADOR DE NEOPLASIAS DO COLO DO ÚTERO**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ CARLOS ZEFERINO**  
**COORIENTAÇÃO: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. SILVIA HELENA RABELO DOS SANTOS**

***EXPRESSION OF PROTEIN SUPEROXIDE DISMUTASE 2  
AS A BIOMARKER OF CERVICAL CANCER***

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação em  
Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas – UNICAMP, para obtenção de Título de Mestra  
em Ciências da Saúde, área de concentração em Oncologia  
Ginecológica e Mamária.

*Master's dissertation presented to the Obstetrics and Gynecology  
Graduate Program of the School of Medical Sciences, University  
of Campinas, to obtain the MSc grade in Health Science,  
specialization in breast and gynecologic oncology.*

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA MARIANA GENARO BURGER  
E ORIENTADA PELO Prof. Dr. LUIZ CARLOS ZEFERINO**

Assinatura do Orientador

---

**Campinas, 2014**

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**  
**JULIANA RAVASCHIO FRANCO DE CAMARGO - CRB 8/6631**

B911e	<p>Burger, Mariana Genaro, 1982- Expressão da proteína superóxido desmutase 2 como biomarcador de neoplasias do colo do útero / Mariana Genaro Burger. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.</p> <p>Orientador : Luiz Carlos Zeferino. Coorientador: Silvia Helena Rabelo dos Santos. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Marcadores biológicos. 2. Superóxido dismutase. 3. Neoplasias do colo do útero. I. Zeferino, Luiz Carlos, 1955-. II. Santos, Silvia Helena Rabelo dos. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.</p>
-------	---

**Informações para Biblioteca Digital**

**Título em outro idioma:** Expression of protein superoxide dismutase 2 as a biomarker of cervical cancer

**Palavras-chave em inglês:**

Biological markers  
Superoxide dismutase  
Uterine cervical neoplasms

**Área de concentração:** Oncologia Ginecológica e Mamária

**Titulação:** Mestra em Ciências da Saúde

**Banca examinadora:**

Luiz Carlos Zeferino [Orientador]  
Joana Froés Bragança Bastos  
Megmar Aparecida dos Santos Carneiro

**Data de defesa:** 27-02-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Tocoginecologia

**Diagramação e arte-final:** Assessoria Técnica do CAISM (ASTEC)

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**MARIANA GENARO BURGER**

Orientador (a) PROF(A). DR(A). LUIZ CARLOS ZEFERINO

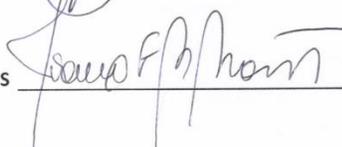
Co-orientador (a) PROF(A). DR(A). SILVIA HELENA RABELO DOS SANTOS

**MEMBROS:**

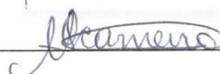
1. PROF(A). DR(A). LUIZ CARLOS ZEFERINO



2. PROF(A). DR(A). JOANA FRÓES BRAGANÇA BASTOS



3. PROF(A). DR(A). MEGMAR APARECIDA DOS SANTOS CARNEIRO



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

Data: 27 de fevereiro de 2014

## ***Dedico este trabalho...***

*...à Deus Jeová, e seu Filho Jesus Cristo, pela perfeição e magnitude da nossa minuciosa criação; aos meus pais, Ivanildo e Maria Regina, e à minha irmã, Marcela, pelo sublime amor, apoio, compreensão, e dedicação para comigo em todos os momentos.*

# Agradecimentos

---

*Agradeço, acima de tudo, a Deus Jeová, e seu Filho Jesus Cristo, por conceder sabedoria e discernimento para a realização deste trabalho.*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino, pelos ensinamentos, paciência, dedicação e por ter me dado a oportunidade e privilégio de ser sua aluna.*

*À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Helena Rabelo dos Santos pela orientação, pelo aprendizado e pela pronta disponibilidade.*

*À Dra. Lara Termini e Maria Cecilia Costa, do Instituto de Pesquisa da Santa Casa de São Paulo, pelo carinho com que me receberam, por toda assistência e disponibilidade para a realização deste trabalho.*

*À Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain e toda equipe médica e enfermagem do ambulatório de patologia cervical, pela grandiosa e dedicada ajuda durante a coleta de amostras.*

*À Dra. Cristina Westin pelo carinhoso acolhimento ao laboratório de citopatologia, pelo amparo e aconselhamentos.*

*Aos funcionários do laboratório de Citopatologia do CAISM, pela assistência e auxílio nos momentos precisos.*

*Ao Dr. Francisco Antonio T. Fazano e equipe, pelo apoio e carinho que demonstraram para comigo.*

*Aos meus amados familiares e amigos que me sempre estiveram ao meu lado.*

*“Ó Jeová, tu me esquadrinhaste e me conheces...  
...Mantiveste-me abrigado no ventre de minha mãe.  
Elogiar-te-ei porque fui feito maravilhosamente, dum modo atemorizante.  
Teus trabalhos são maravilhosos...  
Teus olhos viram até mesmo meu embrião,  
E todas as suas partes estavam assentadas por escrito no teu livro,  
Referente aos dias em que foram formadas,  
E ainda não havia nem sequer uma entre elas.”*

(Salmos 139:1, 13 – 16)

# Sumário

---

Símbolos, Siglas e Abreviaturas .....	x
Resumo .....	xi
Summary .....	xiii
1. Introdução .....	15
2. Objetivos .....	23
2.1. Objetivo geral .....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. Sujeitos e Método .....	24
3.1. Diagnóstico histológico.....	25
3.2. Imunoistoquímica para SOD2 .....	25
3.3. Processamento e Análises dos dados .....	30
3.4. Aspectos éticos da pesquisa.....	31
4. Publicação.....	32
4.1. Artigo 1 .....	32
5. Conclusões.....	51
6. Referências Bibliográficas.....	52
7. Anexos .....	57
7.1. Anexo 1 – Ficha para coleta de dados.....	57
7.2. Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido .....	58
7.3. Anexo 3 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa .....	60
7.4. Anexo 4: Parecer da Comissão de Pesquisa.....	62

# **Símbolos, Siglas e Abreviaturas**

---

**CAF** – Cirurgia de alta frequência

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**HPV** – Papilomavírus humano

**HSIL** – Lesão intraepitelial escamosa de alto grau

**IARC** – *International Agency for research on Cancer*

**LSIL** – Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau

**NIC/ CIN** – Neoplasia intraepitelial cervical (*Cervical intraepithelial neoplasia*)

**ROS** – Espécies oxigênio reativas

**SOD2** – Superóxido desmutase 2

**OR** – *Odds ratio*

# Resumo

---

O papel da proteína SOD2 na carcinogênese e progressão tumoral, particularmente no carcinoma de células escamosas do colo uterino, continua a ser o objeto de incerteza e controvérsia. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a variabilidade na expressão da proteína SOD2 em cortes histológicos de epitélio cervical. Este estudo transversal incluiu 277 mulheres com indicação de procedimento conização ou excisão da zona de transformação devido a suspeita de NIC 2 ou lesão mais grave. A expressão SOD2 foi avaliada por ensaios de imunistoquímica realizada com base na porcentagem de células coradas em áreas representativas do diagnóstico histopatológico. A expressão positiva, independentemente da intensidade foi positivamente associada com o diagnóstico de NIC2/ NIC3 (OR = 2,64; 1,57-4,60) e carcinoma (OR = 14,32; 4,08-50,26). Tomando expressão SOD2 como referência para casos de NIC2/ NIC3, observou-se que a expressão positiva, independentemente da intensidade foi positivamente associada com um diagnóstico de carcinoma (OR = 5,33; 1,56-18,25). Observou-se que a expressão intensa SOD2 foi positivamente associada com o diagnóstico de NIC2/ NIC3 (OR = 7,31; 1,68-31,86) e carcinoma (OR = 36,63; 7,76-172,85). Quando a expressão de SOD2 foi tomada como referência para casos NIC2/ NIC3, observou-se que a

expressão intensa foi positivamente associada com um diagnóstico de carcinoma (OR = 5,01; 2,24-11,20). Expressão SOD2 é observada com maior frequência e mais intensa em NIC2/ NIC3 e carcinoma espinocelular do que em tecido normal / NIC 1. Além disso, a expressão SOD2 também é mais frequente e intensa em carcinomas do que em NIC2/ NIC3. Embora NIC2/ NIC3 e carcinomas invasivos iniciais são lesões contíguas na carcinogênese cervical, a expressão SOD2 pode diferenciá-los.

**Palavras-chave:** biomarcadores, superóxido desmutase 2, neoplasias do colo do útero.

# Summary

---

The role of SOD2 protein in carcinogenesis and tumor progression, particularly in squamous cell carcinoma of the uterine cervix, remains the object of uncertainty and controversy. Therefore this study aimed to evaluate the variability in SOD2 protein expression in histological specimens from cervical epithelium. This study cross-sectional study included 277 women with indication of conization procedure or transformation zone excision due to suspicion of CIN 2 or more severe lesion. The SOD2 expression was assessed by performed immunohistochemical assays based on the percentage of stained cells in representative areas of the histopathological diagnosis. Positive expression regardless of intensity was positively associated with a diagnosis of CIN2/CIN3 (OR=2.64; 1.57- 4.60) and carcinoma (OR=14.32; 4.08-50.26). Taking SOD2 expression as a reference for cases of CIN2/CIN3, it was observed that a positive expression, regardless of intensity was positively associated with a diagnosis of carcinoma (OR=5.33; 1.56-18.25). It was observed that intense SOD2 expression was positively associated with a diagnosis of CIN2/CIN3 (OR=7.31; 1.68-31.86) and carcinoma (OR=36.63; 7.76-172.85). When SOD2 expression was taken as a reference for CIN2/CIN3 cases, it was observed that intense expression was positively associated with a diagnosis of carcinoma

(OR=5.01; 2.24-11.20). SOD2 expression is most frequently observed and more intense in CIN2/CIN3 and squamous carcinoma than in normal tissue/CIN 1. In addition, SOD2 expression is also more frequently observed and intense in carcinoma than in CIN2/CIN3. Although CIN 2/CIN 3 and early invasive carcinomas are contiguous lesions in cervical carcinogenesis, SOD2 expression can differentiate them.

**Keywords:** markers, superoxide dismutase 2, neoplasms of the cervix.

# 1. Introdução

---

O câncer colo do útero é o terceiro tipo mais comum entre as mulheres. A implementação de programas de controle do câncer do colo uterino tem contribuído para reduzir a sua incidência e mortalidade. O controle da doença é embasado em métodos de rastreamento das lesões precursoras do câncer cervical através da citologia do epitélio cervical. [1, 2]

O epitélio atípico do colo do útero recebeu várias denominações ao longo do tempo. O termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC) foi introduzido por Richart (1967), que a subdividiu em NIC 1, NIC 2 e NIC 3, de acordo com a espessura e atipias celulares do epitélio comprometido [3]. A NIC 1 é caracterizada por atipia nuclear mínima, alterações celulares restritas ao terço inferior do epitélio cervical, baixos índices de mitoses e ausência de mitoses anormais. As NIC 2 e NIC 3 são caracterizadas por pleomorfismo e hiper Cromasia mais intensa. Além disso, as atipias chegam até o terço médio do epitélio cervical no caso das NIC 2, ou ocupam o terço superior do epitélio cervical nas NIC 3. [3]

Atualmente, é bem definida a relação causal entre o papilomavírus humano (HPV) e o câncer do colo do útero e suas lesões precursoras. Estudo realizado em 22 países, coordenado pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC), identificou o DNA do HPV em quase todos (99,7% de cerca de 1000) os casos de câncer cervical. O HPV16 foi identificado com maior frequência no carcinoma de células escamosas (55,2%) do que na adenocarcinoma escamoso (31,3%). Por outro lado, o HPV 18 foi mais prevalente no adenocarcinoma escamoso (37,7%) do que no carcinoma de células escamosas (12,3%). [4]

Dentre os vários tipos de HPV, os tipos de HPV 6, 11, 30, 42, 43 e 44 são considerados de baixo risco, e estão relacionados com NIC 1, lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) . Os demais tipos, como o HPV 16, 18 e 45, são denominados de alto risco, responsáveis pelas lesões intraepiteliais escamosas de alto grau, NIC de graus 2 e 3. Em geral, a prevalência de HPV é estimada em 84,2% para HSIL. O HPV16 é o tipo mais comum em HSIL (45,0%) e o HPV 18 apresenta cerca de 7% de prevalência nos casos de HSIL [4, 5].

Se o câncer do colo do útero e suas lesões precursoras são lesões associadas ao HPV, o exame de HPV poderia potencialmente ser usado como uma ferramenta de triagem. Uma característica positiva dos testes de HPV-DNA é a sua maior sensibilidade para a detecção de lesões escamosas intraepiteliais de alto grau quando comparados com a citologia e, além disso, tem alto valor preditivo negativo. [6, 7]

Considerando o caráter multifatorial envolvido na progressão das NIC, ainda existem dúvidas acerca da história natural destas lesões. Originalmente considerava-se que o carcinoma cervical invasivo evoluiria a partir de um continuum gradativo de lesões intraepiteliais, incluindo NIC1, NIC2 e NIC 3. Contudo, uma alternativa a este conceito suporta o fato de que lesões do tipo NIC 2 e NIC 3 podem desenvolver-se rapidamente dentro de 2 ou 3 anos a partir de uma infecção persistente por HPV com alto risco oncogênico. [8]

De fato, há substancial heterogeneidade no diagnóstico microscópico e comportamento biológico da NIC 2. Algumas lesões deste tipo, como a maioria das NIC 1, não deveriam ser considerados verdadeiros precursores do câncer cervical, mas representariam infecções produtivas que albergam HPVs de alto risco oncogênico. A média da idade da mulher no momento do diagnóstico de NIC 2 é cerca de 10 anos menor do que a média de idade no momento do diagnóstico de NIC 3. [9] Em contraste, existem NIC2 que exibem expressões gênicas virais similares às observadas em NIC3, incluindo aumento na expressão de E6 e E7 em células proliferativas. [10]

A maioria das mulheres com diagnóstico de NIC é jovem e existe a necessidade de uma conduta conservadora que não comprometa a eficácia terapêutica, mas que preserve a anatomia e as funções cervicais. Ainda muitos centros têm tratado NIC 2 de forma semelhante à NIC 3. [11]

Neste contexto, alguns biomarcadores com possíveis aplicabilidades no diagnóstico do câncer de colo de útero têm sido analisados. Os biomarcadores são

indicadores do estado fisiológico e de alterações que ocorrem durante o processo neoplásico e sua expressão pode refletir diversos processos em andamento nas células tumorais, como hiperproliferação, alteração de padrões de expressão gênica, hiperplasia, genotoxicidade, inflamação, alterações enzimáticas relacionadas com o desenvolvimento tumoral, entre outros [12]. Villa & Termini (2008) [6, 12], em um estudo comparando o perfil de expressão gênica entre carcinomas cervicais e queratinócitos normais identificaram mais de 500 genes diferencialmente expressos, entre eles alguns biomarcadores como CDKN2A/p16INK4a, topoisomerase 2A, P-caderina, calicreína (hk7), Superóxido desmutase 2 (SOD2), entre outros possíveis biomarcadores.

A superóxido desmutase (SOD) é uma metaloenzima que atua como antioxidante no sistema celular. Dentre as três isoformas distintas de SOD (SOD1, 2 e 3) já identificadas, sendo que a SOD2 (codificada pelo gene SOD2, no cromossomo humano 6q25) é encontrada exclusivamente na matriz mitocondrial, enquanto que SOD1 e SOD3 encontram-se, respectivamente, no citoplasma e meio extracelular. [13, 14, 15] É conhecido que o SOD2 está envolvido com a regulação da inflamação através de reações com peróxido de hidrogênio. Estas proteínas protegem a célula de espécies oxigênio reativas (*ROS*) através da conversão de radicais superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Devido ao seu papel no metabolismo celular, as mitocôndrias são as produtoras de *ROS*. O *stress* oxidativo, importante fator para o desenvolvimento do câncer, é resultado do aumento dos níveis de radicais superóxido e *ROS* que excedem aos mecanismos antioxidantes regulatórios desempenhados pelo

SOD2 e outras moléculas envolvidas neste processo. Ou seja, é uma condição que surge quando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) não é compensada pelo sistema antioxidante. ROS são constantemente geradas em células aeróbicas através do metabolismo mitocondrial, bem como durante processos de inflamação, infecção, exposição à radiação ultravioleta e à irradiação ionizante. [15, 16, 17] A mitocôndria desempenha um importante papel na apoptose e na proliferação celular e o SOD2 pode estar diretamente envolvido na carcinogênese protegendo contra danos mitocondriais. Evidências têm indicado que espécies reativas de oxigênio (ROS) estão envolvidas na iniciação e progressão da carcinogênese. [17, 18, 19]

Há vários estudos analisando a expressão do SOD2 e a agressividade tumoral. A desregulação da SOD2 em carcinoma de células escamosas da língua tem valores potenciais preditivos para metástase linfonodal. Liu et al [20] demonstraram que os níveis de mRNA de SOD2 em tecido de carcinoma de células escamosas da língua eram maiores do que em tecidos normais. Observou-se também que os níveis deste mRNA eram menores nos tumores de menor dimensão em sua localização primária e naqueles com invasão linfonodal. Estes achados sugerem que os níveis de SOD2 estão associados positivamente à carcinogênese e negativamente à invasividade linfonodal. Os dados atuais também sugerem que a presença de SOD2 rs4880 genótipos pode contribuir para a progressão do câncer, bem como a agressividade do tumor. Contudo, a maior expressão da SOD2 parece estar associada ao maior número de metástases do tumor. [20, 21, 22]

Todavia, há controvérsias sobre o padrão da expressão de SOD2 no desenvolvimento e progressão do câncer. Inicialmente parecia que a expressão de SOD2 diminuiria com a progressão e gravidade da lesão provavelmente porque estaria associada com a geração de radicais livres que causariam danos ao DNA. [23, 24, 25, 26]

Segundo Balasubramaniyan, N. et al.[23], dentre outros autores [20, 26, 27] encontraram baixa atividade da superóxido desmutase na carcinogênese. Os danos celulares causados pelos metabólitos de ROS também poderiam ser responsáveis por propriedades das células cancerosas e de certas diferenças bioquímicas entre os tecidos malignos e normais. Um aumento nas formas ativadas de oxigênio na célula, devido ao excesso de produção e da incapacidade de destruí-los, poderia conduzir a graves danos de moléculas e estruturas celulares. Entre as consequências biológicas dessa ação há mutações, aberrações cromossômicas, carcinogênese e degeneração.

O papel de SOD2 no início e na progressão do câncer é caracterizado por uma rede complexa de eventos que enfatiza a natureza multifatorial desta enzima e os seus efeitos sobre os processos celulares importantes, como a proliferação, crescimento e diferenciação celular. Os estudos *in vitro* demonstraram que a superexpressão dos membros da família SOD se correlacionam com um aumento da diferenciação celular, redução do crescimento e proliferação celular. [7]

Alterações de SOD estão combinadas com uma série de doenças incluindo cânceres de colorretal, estômago e esôfago, colo do útero, mama,

próstata, pulmão e fígado. Além disso, estudos têm demonstrado que a expressão da proteína SOD2 é aumentada em células de câncer quando comparadas com os seus homólogos normais. [7, 28, 30]

Em relação à neoplasia do colo do útero, dados do estudo de Termini et. al [7], a avaliação da expressão de SOD2 demonstrou que o percentual de amostras que apresentavam coloração intensa para SOD2 (> 50% de células positivas) foi maior em HSIL e carcinoma cervical escamoso quando comparados com amostras LSIL. Contudo, observaram uma associação significativamente positiva entre o nível elevado da expressão de SOD2 (> 50% de células marcadas) e o grau de lesão cervical. Os resultados deste estudo mostraram uma tendência entre a positividade para SOD2 e a gravidade da doença cervical, especulando ainda que o aumento dos níveis de SOD2 em células tumorais pode conferir uma adaptação, favorecendo o estabelecimento e progressão tumoral. Esta expressão exacerbada de SOD2 pode indicar que nestas células existe uma produção elevada de radicais superóxido. [12]

Demirci, S. et al. [29] também encontraram atividades elevadas de SOD em pacientes com câncer do colo do útero em comparação com o grupo-controle e demonstraram que pacientes com menos de 60 anos de idade têm menor atividade SOD. Tal achado pode ser explicado pela teoria do radical livre mitocondrial do envelhecimento. Concluíram, dessa forma, que a capacidade antioxidante é alterada em doentes com o câncer do colo do útero em comparação com controles saudáveis, mas não é claro se SOD é a causa ou a consequência do processo de carcinogênese.

Parece que quando o SOD2 está diminuído as células estariam mais vulneráveis à infecção pelo HPV para o desenvolvimento do câncer cervical, o que sugere que estresse oxidativo ou deficiência antioxidante poderia estar associado com o câncer cervical. Essa deficiência no sistema antioxidante seria responsável pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e pelos danos no DNA em células cervicais. [28]

Portanto, o papel da proteína SOD2 na carcinogênese, progressão tumoral e a capacidade de invadir os carcinomas, em especial o carcinoma escamoso do colo do útero, ainda é objeto de dúvidas e de controvérsias em estudos até então disponíveis. Diante do exposto, pretendeu-se avaliar a variabilidade da expressão da proteína superóxido desmutase 2 (SOD2) nos espécimes histológicos do epitélio do colo do útero em mulheres que tiveram algum exame citológico alterado, previamente diagnosticados no rastreamento do câncer do colo do útero.

## 2. Objetivos

---

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a variabilidade da expressão da proteína superóxido desmutase2 (SOD2) em função da severidade das neoplasias do epitélio do colo do útero.

### 2.2. Objetivos específicos

- Testar a associação da expressão da proteína SOD2 positiva, qualquer que seja a intensidade, com diagnóstico histológico da neoplasia do colo do útero.
- Testar a associação da expressão intensa da proteína SOD2 com diagnóstico histológico da neoplasia do colo do útero.

## 3. Sujeitos e Método

---

Este estudo foi uma análise de corte transversal que incluiu 277 mulheres com indicação de conização ou excisão da zona de transformação por suspeita de NIC 2 ou lesão mais grave. Todas as mulheres eram oriundas do programa de rastreamento do câncer do colo do útero entre janeiro de 2011 e janeiro de 2013, apresentaram um exame citológico alterado e foram encaminhadas para o ambulatório de patologia cervical do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti-CAISM, Unicamp. Não foram incluídas as mulheres grávidas, que revelaram diagnóstico de adenocarcinoma ou não tinham material suficiente para as análises imunoistoquímicas.

As mulheres foram submetidas ao exame clínico cuidadoso, com inspeção dos genitais externos e região perianal e avaliação colposcópica para delimitação da imagem suspeita e identificação da junção escamocolunar (JEC). O procedimento de conização ou excisão da zona de transformação foi realizado por cirurgia de alta frequência (CAF) por suspeita ou diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical graus 2 e 3, de acordo com manual clínico da instituição. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de acordo com as normas vigentes e a inclusão ocorreu após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

**Tabela 1.** Distribuição das mulheres incluídas no estudo de acordo com o diagnóstico histológico.

<b>Diagnóstico</b>	<b>Submetidas à excisão da Zona de transformação ou conização</b>
Sem neoplasia	68
NIC 1	21
NIC 2	65
NIC 3	88
Carcinoma	35
Total	277

### **3.1. Diagnóstico histológico**

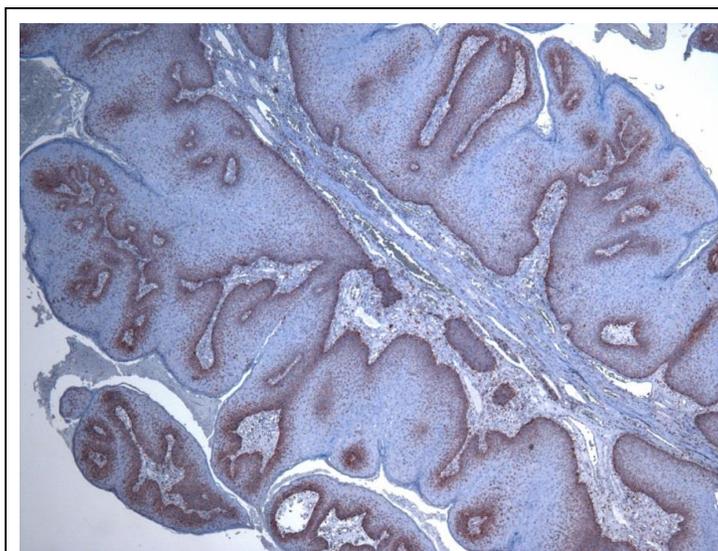
A classificação seguiu os critérios da Organização Mundial da Saúde: negativos, neoplasia intraepitelial cervical (NIC 1, NIC2, NIC3), carcinoma escamoso, adenocarcinoma *in situ* e adenocarcinoma invasor. Todos os casos foram corados pela técnica Hematoxilina-eosina e diagnosticados através da leitura em microscópio óptico. A tabela 1 mostra a distribuição das mulheres incluídas no estudo de acordo com o diagnóstico histológico.

### **3.2. Imunoistoquímica para SOD2**

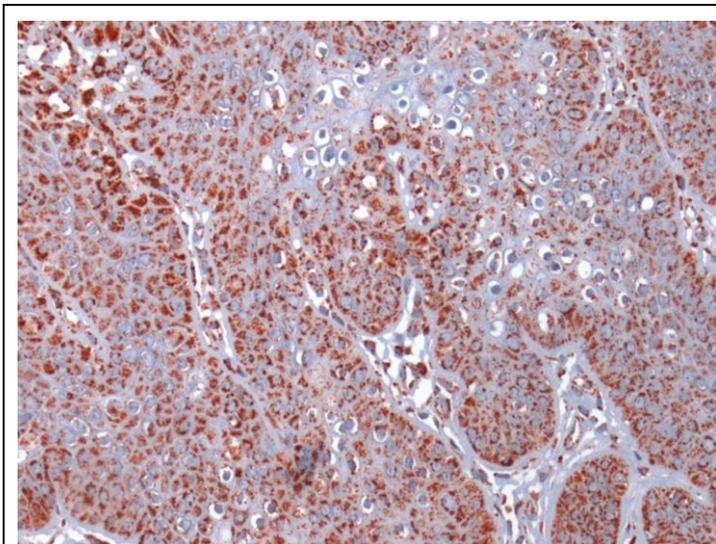
Para a imunoistoquímica, foram feitos cortes de 3 micrômetros de tecidos previamente fixados em formalina, incluídos em parafina e corados pela hematoxilina/eosina. Esses cortes foram analisados para a seleção das áreas apropriadas de cada bloco proveniente da conização. Após a seleção dessas áreas, foram realizados outros cortes em lâminas convencionais para o uso nas reações de imunoistoquímica.

Foi feita uma padronização prévia. As reações imunoistoquímicas para avaliação da expressão de SOD2 foram realizadas nas concentrações que forneceram cortes corados de melhor qualidade, como segue: *SOD2 – Abcam – 13533 - 1:3000 = 10% soro cavalo + Ac. Primário + PBS (3600ul TBS + 400 ul soro cavalo + 1,33 ul Ac. Primário).*

A figura 1 mostra o controle negativo para o ensaio imunoistoquímico com SOD2 em tecido de condiloma acuminado. A figura 2 mostra o controle positivo do ensaio imunoistoquímico para SOD2 em tecido de neoplasia intraepitelial cervical grau 2 (NIC 2).



**Figura 1.** *Tecido de condiloma acuminado mostrando controle negativo do ensaio imunoistoquímico para SOD2 (Abcam – 13533 - 1:1500). Não considerar as regiões de hiperplasia.*



**Figura 2.** Tecido de neoplasia intraepitelial cervical grau 2 (NIC 2) mostrando controle positivo do ensaio imunoistoquímico para SOD2 (Abcam – 13533 - 1:1500)

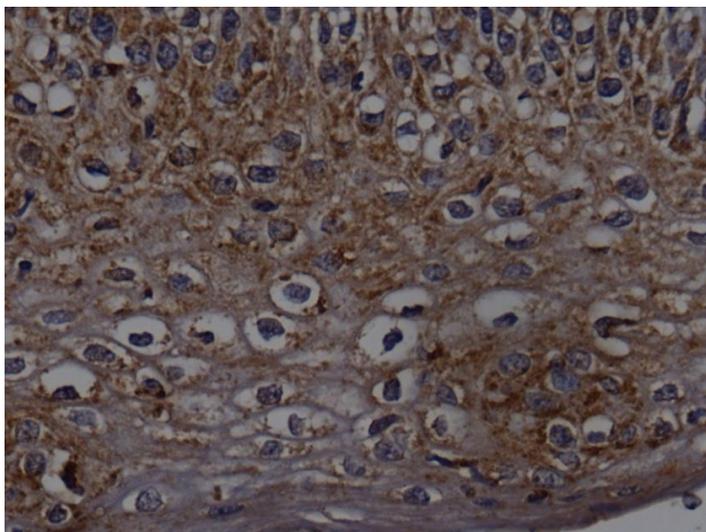
O *kit* usado na padronização das reações foi *kit* Novo Link Max Polymer Detection System – Leica. Inicialmente os cortes foram desparafinados e reidratados, como descrito a seguir: 45 min. em estufa, 2x 10 min. xilol, 1x 10 min. etanol 100%, 1x 5 min etanol 95%, 1x 5 min etanol 70%, 2x 5 min em água destilada. A recuperação do antígeno foi realizada acrescentando o antígeno retrieval nas seguintes concentrações: 20 min. em Citrato de Sódio 10mM pH 6 (95° C) em microondas ou Banho Maria a 95° C, e 20 min a temperatura ambiente da solução composta por 540 ml H<sub>2</sub>O, 60 ml Citrato de Sódio- (100 mM pH – 6,0 – 29,1g Tri-sódio- Citrato dihidratado em 1 litro de H<sub>2</sub>O. A solução de uso foi diluída na concentração de 1:10). Foi realizada a lavagem com H<sub>2</sub>O destilada 2 vezes, por 5 minutos, e a neutralização da peroxidase endógena, empregando para tal a *Peroxidase Block* durante 5 minutos dentro de uma câmara escura. Seguiu-se nova lavagem com TBS 2 vezes por 5 minutos. A diluição do anticorpo foi preparada na concentração padronizada e as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário em câmara escura em geladeira *over night*. Após a incubação, as

lâminas foram lavadas com PBS 2 vezes por 5 minutos. O anticorpo secundário foi adicionado na seguinte concentração: SOD2 – Abcam – 13533 – diluição 1:3000. Procedeu-se à incubação com Novocastra Post Primary block – kit Leica - 30 minutos em câmara escura a temperatura ambiente. Nova lavagem em PBS 2 vezes por 5 minutos e nova incubação com *Polymer* durante 30 minutos. Seguiu-se nova lavagem com tampão TBS 2 vezes por 5 minutos e preparo da solução para a revelação (1mL DAB substrate buffer + 50 ul chromogen). A solução foi colocada sobre as lâminas por dois minutos, seguida da imersão em água. A coloração com hematoxilina foi realizada pela imersão das mesmas no corante por 1 minuto e 10 segundos e lavagem em água. A montagem foi realizada após a imersão das lâminas em álcool e xilol. Para as reações foram preparadas amostras como controle positivo e negativo, como controle de cada ciclo da reação, para constatar que não houve contaminações ou problemas relacionados a este fato durante a reação.

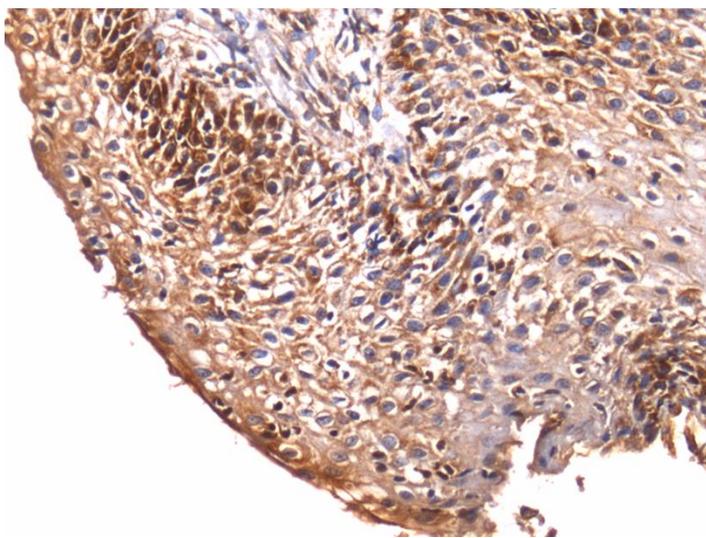
Para a análise da expressão de proteína SOD2 na histologia, a reação imunohistoquímica positiva foi avaliada considerando o percentual de células coradas em cada área representativa do diagnóstico histopatológico. Reações positivas foram semi quantitativamente interpretadas como: negativa/fracamente positiva (< 10% de células coradas), moderada positividade (10% a 50% de células coradas) e intensa positividade (>50% de células coradas). As reações imunohistoquímicas foram avaliadas por dois observadores. As divergências foram resolvidas pelo consenso. Controles positivos e negativos foram incluídos em cada reação. [31] Amostras normais de tecido humano da pele foram

usadas como controle positivo de expressão SOD2 (coloração contínua da membrana da célula / proliferativa basal camada).

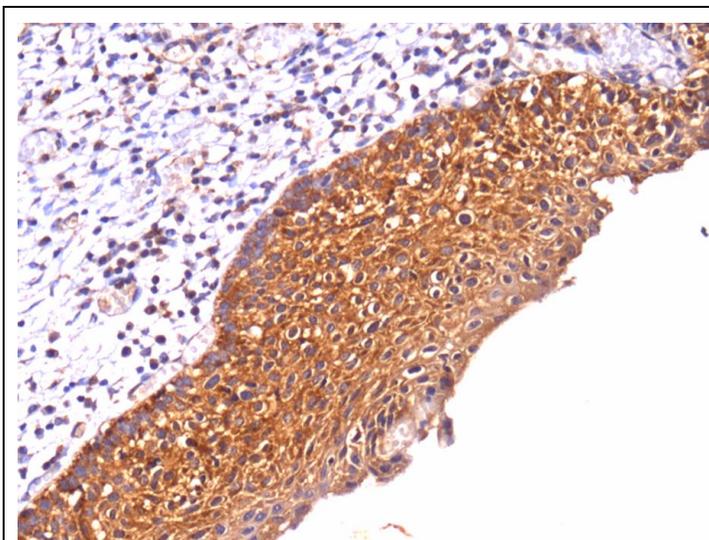
As figuras de 3 a 6 ilustram as reações imunoistoquímicas com SOD2 em casos deste estudo.



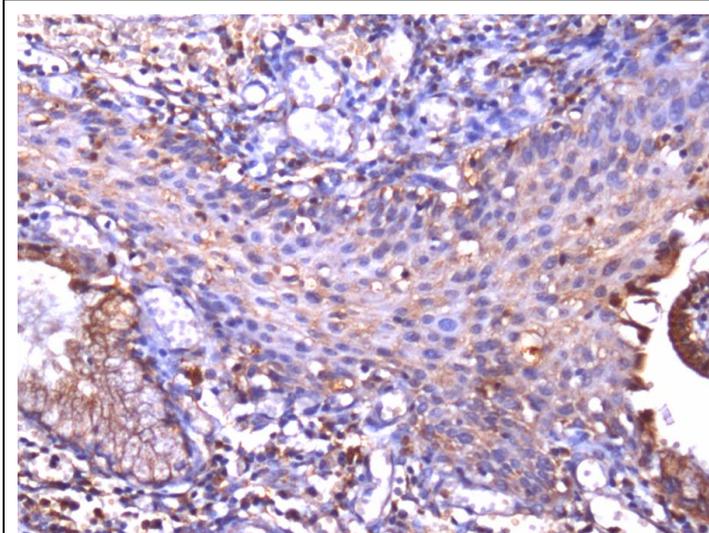
**Figura 3.** Tecido de neoplasia intraepitelial cervical grau 2 (NIC 2) com expressão moderada para SOD2



**Figura 4.** Tecido de neoplasia intraepitelial cervical grau 3 (NIC 3) com expressão leve para SOD2 no ensaio imunoistoquímico



**Figura 5.** *Tecido de neoplasia intraepitelial cervical grau 3 (NIC 3) com expressão intensa para SOD2 no ensaio imunoistoquímico.*



**Figura 6.** *Tecido de neoplasia intraepitelial cervical grau 3 (NIC 3) com expressão negativa para SOD2.*

### 3.3. Processamento e Análises dos dados

Os dados foram coletados em formulário específico sempre pelo mesmo pesquisador. O arquivo gerado foi transportado para o programa SAS 8.2 para realização da análise estatística. Para estimar a magnitude da associação entre duas variáveis categóricas foi calculado o *odds ratio* (OR), com seu respectivo intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

### **3.4. Aspectos éticos da pesquisa**

O objetivo do presente estudo é verificar a variabilidade da expressão da proteína superóxido desmutase2 (SOD2) em função da severidade das neoplasias do epitélio do colo do útero. Os programas de prevenção de câncer do colo uterino incluem o rastreamento pela citologia, biópsia dirigida pela colposcopia e tratamento das lesões precursoras. Outras formas incluem o rastreamento da infecção por HPV, cuja utilização restringe-se a poucos países desenvolvidos e à inspeção visual pelo ácido acético utilizada em alguns países subdesenvolvidos. A avaliação de novos métodos que possam agregar valor ao diagnóstico citológico/ histológico é importante para propiciar a propeidética complementar e o tratamento das lesões neoplásicas cervicais.

As investigações clínicas constantes ao presente projeto, biópsia em pontos ou por CAF, são necessárias para esclarecer as alterações encontradas no exame preventivo. O anonimato da paciente foi mantido, bem como a sua participação no estudo, e incluiu o direito de aceitar ou não. A não aceitação não implica prejuízo à paciente. A participação foi realizada após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e foram cumpridas as recomendações do “Guiding Medical Doctors in Biomedical Research involving Human Subjects” da DECLARAÇÃO DE HELSINQUE, revisada em Hong-Kong e da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde.

# 4. Publicação

---

## 4.1. Artigo 1

-----Mensagem Original-----

From: JBM

Sent: Tuesday, February 18, 2014 3:02 PM

To: Luiz Carlos Zeferino

Subject: Submission Confirmation for EXPRESSION OF PROTEIN  
SUPEROXIDE

DISMUTASE 2 AS A BIOMARKER OF CERVICAL CANCER

Dear Dr. Zeferino,

Your submission entitled "EXPRESSION OF PROTEIN SUPEROXIDE  
DISMUTASE 2 AS A  
BIOMARKER OF CERVICAL CANCER" has been received by The International  
Journal  
of Biological Markers

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to  
Editorial Manager as an author. The URL is <http://jbm.edmgr.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been  
assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

The International Journal of Biological Markers

## **EXPRESSION OF PROTEIN SUPEROXIDE DISMUTASE 2 AS A BIOMARKER OF CERVICAL CANCER**

Burger MG<sup>1</sup>, Rabelo-Santos SH<sup>2</sup>, Termini L<sup>3</sup>, Longatto- Filho A<sup>4</sup>, Villa LL<sup>3</sup>, De Ângelo-Andrade LA<sup>5</sup>, Derchain S<sup>1</sup>, Zeferino LC<sup>1</sup>.

- 1- Department of Obstetrics and Gynecology of School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP).
- 2- School of Pharmacy of Federal University of Goiás.
- 3- School of Medicine of Santa Casa de São Paulo, INCT-HPV.
- 4- Laboratory of Medical Research of School of Medicine, University of São Paulo (USP).
- 5- Laboratory of Pathology of School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP).

**Corresponding Author:** Dr. Luiz Carlos Zeferino

Department of Obstetrics and Gynecology of School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), 101 Rua Alexander Fleming, 13083-881 Campinas, SP, Brazil.

Tel: +55 19 3521-9516

e-mail adress: [zeferino@fcm.unicamp.br](mailto:zeferino@fcm.unicamp.br)

**Financial support:** Foundation for Research Support of the State of São Paulo (FAPESP, funding concession number 2012/16059-1).

## **Abstract**

The role of SOD2 protein in carcinogenesis and tumor progression, particularly in squamous cell carcinoma of the uterine cervix, remains the object of uncertainty and controversy. Therefore this study aimed to evaluate the variability in SOD2 protein expression in histological specimens from cervical epithelium. This study cross-sectional study included 277 women with indication of conization procedure or transformation zone excision due to suspicion of CIN 2 or more severe lesion. The SOD2 expression was assessed by performed immunohistochemical assays based on the percentage of stained cells in representative areas of the histopathological diagnosis. Positive expression regardless of intensity was positively associated with a diagnosis of CIN2/CIN3 (OR=2.64; 1.57- 4.60) and carcinoma (OR=14.32; 4.08-50.26). Taking SOD2 expression as a reference for cases of CIN2/CIN3, it was observed that a positive expression, regardless of intensity was positively associated with a diagnosis of carcinoma (OR=5.33; 1.56-18.25). It was observed that intense SOD2 expression was positively associated with a diagnosis of CIN2/CIN3 (OR=7.31; 1.68-31.86) and carcinoma (OR=36.63; 7.76-172.85). When SOD2 expression was taken as a reference for CIN2/CIN3 cases, it was observed that intense expression was positively associated with a diagnosis of carcinoma (OR=5.01; 2.24-11.20). SOD2 expression is most frequently observed and more intense in CIN2/CIN3 and squamous carcinoma than in normal tissue/CIN 1. In addition, SOD2 expression is also more frequently observed and intense in carcinoma than in CIN2/CIN3. Although CIN 2/CIN 3 and early invasive carcinomas are contiguous lesions in cervical carcinogenesis, SOD2 expression can differentiate them.

**Keywords:** biomarkers, superoxide dismutase 2, cervical cancer.

## Introduction

Cervical cancer is an important cause of death that arises from well-defined precursor lesions [1,2]. In this context, some biomarkers with possible applicability in the diagnosis of cervical cancer and its precursor lesions have been analyzed [3]. Villa & Termini (2008) [4], analyzing gene expression profile among cervical carcinomas and normal keratinocytes, identified more than 500 differentially expressed genes, including superoxide dismutase 2 (SOD 2).

Superoxide dismutase (SOD) is a metalloenzyme that acts as an antioxidant in the cellular system, presenting three distinct isoforms (SOD1, 2 and 3). SOD2 is found exclusively in the mitochondrial matrix and is involved in the regulation of inflammation through reactions with hydrogen peroxide [5, 6]. These proteins afford the cell protection against reactive oxygen species (ROS) through the conversion of superoxide radicals into hydrogen peroxide and oxygen.

Oxidative stress is a condition that occurs when the production of reactive oxygen species (ROS) is not compensated by the antioxidant system. ROS are constantly generated in aerobic cells by incomplete reduction of molecular O<sub>2</sub> from water formation during mitochondrial oxidative phosphorylation, inflammatory and infectious processes, as well as exposure to ultraviolet radiation and ionizing radiation [7, 8, 9]. Evidence has indicated that reactive oxygen species (ROS) are involved in the initiation and progression of carcinogenesis [10].

Nevertheless, there is controversy concerning the SOD2 expression pattern in cancer development and progression. It was initially believed that SOD2 expression decreased with the progression and severity of the lesion probably due to the generation of free radicals causing DNA damage [11, 12, 13, 14].

More recently, Liu et al. [15] demonstrated that SOD2 mRNA levels in tongue cancer tissue were higher than in normal tissue and were inversely lower in small size primary tumors and tumors with lymph node invasion. These findings have suggested that SOD2 levels are positively associated with carcinogenesis and local disease progression and negatively associated with lymph node invasiveness.

Termini et. al [16] demonstrated that immunohistochemical SOD2 expression (> 50% positive cells) was more intense in high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) and squamous cell cervical carcinoma than in low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL). Demirci, S. et al.[17] also found high SOD activities in patients with cervical cancer than in nonmalignant tissue. [5] In cervical epithelium carcinogenesis, a decrease in SOD2 expression could contribute to make these cells more vulnerable to HPV infection and the development of carcinoma. [18]. Therefore, the more severe the lesion, the higher the SOD2 expression [5].

Therefore, the role of SOD2 protein in carcinogenesis, tumor progression and invasive capacity of carcinomas, particularly in squamous cell carcinoma of the uterine cervix, remains the object of uncertainty and controversy. Given the above, the aim of this study was to evaluate the variability in SOD2 protein expression in histological specimens from cervical epithelium.

## **Methodology**

This study was a cross-sectional analysis, including 277 women with indication of conization procedure or transformation zone excision due to suspicion of CIN 2 or more severe lesion. All women originated from the cervical cancer screening program carried out between January 2011 and December

2012. These patients had an altered cytological test and were referred to the cervical pathology outpatient clinic in the Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti Women's Hospital-CAISM, Unicamp. Pregnant women, patients diagnosed with adenocarcinoma or those with insufficient material for immunohistochemical analysis were not included in the study. The women underwent a careful clinical examination with inspection of the external genitalia and perianal region, as well as colposcopic evaluation for delimitation of the suspected image and identification of the squamocolumnar junction (SCJ). Conization procedure and transformation zone excision were performed by high-frequency surgery (HFS) due to suspicion or diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia grades 2 and 3, according to the clinical manual of the institution. The project was approved by the Research Ethics Committee according to current guidelines. Patients were included in the study after a free written informed term was signed.

Diagnosis was histologically established in tissues stained with the hematoxylin-eosin staining technique, according to the World Health Organization criteria. Histological sections from surgical specimens were reviewed to select those containing the lesion for immunohistochemical analysis.

Immunohistochemical reactions for assessment of SOD2 expression were performed in concentrations that provided stained sections of the highest quality, as follows: *SOD2 – Abcam – 13533 - 1:3000 = 10% horse serum + Primary Antibody + PBS (3600ul TBS + 400 ul horse serum + 1.33 ul Primary Antibody)*. The kit used for standardizing the reactions was the Novo Link Max Polymer Detection System – Leica. Initially, the sections were deparaffinized and rehydrated. Antigen retrieval was performed, adding antigen retrieval solution in the following

concentrations: 20 min. sodium citrate 10mM pH 6 (95° C) in the microwave or hot water bath treatment at 95° C, 20 min. in a solution composed of 540 ml H<sub>2</sub>O, 60 ml sodium citrate- (100 mM pH – 6.0) at room temperature. Washing was done twice with distilled H<sub>2</sub>O for 5 minutes and neutralization of endogenous peroxidase was performed, employing Peroxidase Block during 5 minutes inside a dark chamber. Additional washing with TBS was done twice for 5 minutes. Antibody dilution was prepared in the standardized concentration, incubating the slides with primary antibody in a dark chamber stored in a refrigerator overnight. After incubation, the slides were washed twice with PBS for 5 minutes. The secondary antibody was added in the following concentration: SOD2 – Abcam – 13533 – dilution 1:3000. Incubation with Novocastra Post Primary block – kit Leica - 30 minutes was performed in a dark chamber at room temperature. Sections were rinsed in 2 changes of a buffered PBS solution for 5 minutes, performing additional polymer incubation during 30 minutes. Then sections were rinsed in two changes of a buffered TBS solution for 5 minutes and the solution was prepared for development (1mL DAB substrate buffer + 50 ul chromogen). Slides were immersed in DAB solution for two minutes followed by rinsing in water. Slides were immersed in the staining dish containing Hematoxylin for 1 minute and 10 seconds and rinsed with water. Mounting was performed after immersion of the slides in alcohol and xylene. For the reactions, samples such as positive and negative controls were prepared, as well as controls for each cycle of the reaction, to confirm that no contamination or problems related to this factor occurred during any step of the reaction.

For histological analysis of SOD2 protein expression, a positive immunohistochemical reaction was evaluated considering the percentage of stained cells in each representative area of the histopathological diagnosis. Positive reactions were semi-quantitatively interpreted as: negative/weakly positive (< 10% of stained cells), moderately positive (10% to 50% of stained cells) and intensely positive (>50% of stained cells). Immunohistochemical reactions were assessed by two observers. Divergences were resolved by consensus. Positive and negative controls were included in each reaction. [21] Normal samples of human skin tissue were used as positive control of SOD2 expression (continuous staining of the cell membrane/ proliferative basal layer). Figures 1 and 2 illustrate immunohistochemical reactions with SOD2 in cases of this study.

Data was invariably collected in a specific form by the same researcher. The file generated was transported to the SAS 8.2 program for the performance of statistical analysis. To estimate the magnitude of association between two categorical variables, the odds ratio (OR), with their respective 95% confidence interval (95% CI) were calculated.

## **Results**

The study sample was composed of 68 women diagnosed with cervicitis, 21 cases of CIN 1, 65 cases of CIN 2, 88 cases of CIN 3 and 35 cases of squamous cell carcinoma (SCCI). It was observed that 61.8%, 33.0% and 8.6% of the cases of cervicitis, CIN 3 and SCCI, respectively, had a negative SOD2 expression. Intense SOD2 expression was observed in 2.9%, 14.8% and 45.7% of cases cervicitis, CIN 3 and carcinoma, respectively (Table 1).

Taking SOD2 expression as a reference for cases of cervicitis, it was observed that a positive expression regardless of intensity was positively associated with a diagnosis of CIN2/CIN3 (OR = 2.64; 1.57- 4.60) and carcinoma (OR=14.32; 4.08-50.26). Taking SOD2 expression as a reference for cases of CIN2/CIN3, it was observed that a positive expression, regardless of intensity was positively associated with a diagnosis of carcinoma (OR= 5.33; 1.56-18.25). (Table 2)

Taking SOD2 expression as a reference for cases of cervicitis, it was observed that intense SOD2 expression was positively associated with a diagnosis of CIN2/CIN3 (OR=7.31; 1.68 - 31.86) and carcinoma (OR= 36.63; 7.76 - 172.85). When SOD2 expression was taken as a reference for CIN2/CIN3 cases, it was observed that intense expression was positively associated with a diagnosis of carcinoma (OR= 5.01; 2.24-11.20) (Table 3).

## **Discussion**

According to the results of this study, SOD2 expression is most frequently observed in CIN2/CIN3 and squamous cell carcinoma than in normal tissue or CIN1. Furthermore, SOD2 expression is most frequently observed in carcinoma than in CIN2/CIN3. Intense SOD2 expression is strongly associated with squamous cell carcinoma. To be more precise, there is a significant association for any positive SOD2 expression. In more severe lesions, SOD2 overexpression was observed in 66.7% for CIN2/ CIN3 and more than 90% for SCC.

These findings may have considerable clinical significance, since the cervical carcinoma cases included in this study were diagnosed by conization

procedure, i.e., cases of early invasion and subclinical lesions. Although CIN 2/CIN 3 and early invasive carcinomas are contiguous lesions in cervical carcinogenesis, SOD2 expression is more intense and statistically significant in invasive lesions of the uterine cervix. Therefore, the question is whether SOD2 expression can identify CIN 2 and CIN 3 with the highest potential for invasion. These results also suggest that oxidative stress may have an important role in cervical carcinogenesis, especially in the transformation from an intraepithelial to an invasive lesion. An increase in SOD2 expression could be an attenuating mechanism for this effect.

In contrast, according to a review by Bin Jiang et. al [18], oxidative stress may be associated with cervical cancer, since studies have reported the relationship between antioxidant deficiency (SOD) and cervical cancer. There are indications that when SOD2 is decreased, cells may become more vulnerable to HPV infection leading to the development of cervical cancer. This suggests that oxidative stress or antioxidant deficiency may be associated with cervical cancer. This deficiency in the antioxidant system would be responsible for the production of reactive oxygen species and DNA damage in cervical cells [18].

Termini et. al [16] conducted a similar study and obtained similar results. However, the sample in that study was more homogeneous by selection criteria, including cases without cervical neoplasm and early invasive carcinoma cases. Po-Ming Chen et. al [6] also observed that levels of SOD2 expression were higher in more aggressive lung adenocarcinoma cells.

Findings reported by Liu et al. [15] showed that SOD2 mRNA levels in tongue cancer tissue were higher than in normal tissues. Those authors also

observed that the larger the tumor size at the primary site, the higher the SOD2 mRNA levels. In contrast, cases with lymph node metastases had lower levels than lymph nodes without metastases. These findings suggest that SOD2 may play a different role from the time of primary tumor growth to the appearance of metastases.

In conclusion, SOD2 expression is most frequently observed and more intense in CIN2/CIN3 and squamous carcinoma than in normal tissue/CIN 1. In addition, SOD2 expression is also more frequently observed and intense in carcinoma than in CIN2/CIN3. Identification of potential markers of cervical cancer progression is important, since it offers a wide range of possibilities for adopting a more conservative approach in the presence of these lesions, which can be clinically significant for younger women in particular.

**Acknowledgements: Dr. Maria Cristina Westin and Maria Cecilia Costa for their help. Financial support: Foundation for Research Support of the State of São Paulo (FAPESP), funding concession number 2012/16059-1.**

## Referências Bibliográficas

1. Zeferino LC, Derchain SF. Cervical cancer in the developing world. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2006, 20:339-54.
2. [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site+/home+/noticias/2013/inca\\_ministerio\\_saude\\_apresentam\\_estimativas\\_cancer\\_2014](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site+/home+/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014). [Acesso em: 10 fev 2014].
3. Srinivas PR, Kramer BS, Srivastava S. Trends in biomarker research for cancer detection. *Lancet Oncol.* 2001; 2(11): 698-704.
4. Villa LL, Termini L. Biomarcadores na triagem do câncer do colo uterino. *DST – J bras Doenças Sex Transm* 2008, 20:125-31.
5. Hitchler MJ, Wikainapakul K, Yu L, et al. Epigenetic Regulation of Manganese Superoxide Dismutase Expression in Human Breast Cancer Cells. *Epigenetics.* 2006, 1 (4): 163-171.
6. Po-Ming Chen, Tzu-Chin Wu, Yao-Chen Wang, Ya-Wen Cheng, Gwo-Tarng Sheu, Chih-Yi Chen, Huei Lee. Activation of NF- $\kappa$ B by SOD2 promotes the aggressiveness of lung adenocarcinoma by modulating NKX2-1-mediated IKK $\beta$  expression. *Carcinogenesis.* 2013, 34 (11): 2655–2663.
7. Gallagher CJ, Ahn K, Knipe AL, Dyer AM, Richie JP, Lazarus P, Muscat JE. Association between haplotypes of manganese superoxide dismutase (SOD2), smoking, and lung cancer risk. *Free Radic Biol Med.* 2009, 46:20-24.

8. Xu Y, Fang F, Dhar SK, Bosch A, St Clair WH, Kasarskis EJ, St Clair DK. Mutations in the SOD2 promoter reveal a molecular basis for an activating protein 2-dependent dysregulation of manganese superoxide dismutase expression in cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2008, 6:1881-1893.
9. De Marco F, Bucaj E, Foppoli C, Fiorini A, Blarzino C, Filipi K, Giorgi A, Schininà ME, Di Domenico F, Coccia R, Butterfield DA, Perluigi M. Oxidative stress in HPV-driven viral carcinogenesis: redox proteomics analysis of HPV-16 dysplastic and neoplastic tissues. *PLoS One.* 2012; 7(3):e34366. doi: 10.1371/journal.pone.0034366. Epub 2012 Mar 28.
10. Oshima H, Bartsch H. Chronic infection and inflammatory process as cancer risk Factors: Possible role of nitric oxidative in carcinogenesis. *Mutat Res.* 1994, 305:253-64.
11. Balasubramanian N, Subramanian S, Govindasamy S. Status of antioxidant systems in human carcinoma of uterine cervix. *Cancer Lett.* 1994;87:187-92.
12. Williams VM, Filippova M, Soto U, Duerksen-Hughes PJ. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol.* 2011 Jan; 6 (1): 45-57.
13. Naidu MS, Suryakar AN, Swami SC, Katkam RV, Kumbar KM. Oxidative stress and antioxidant status in cervical cancer patients. *Indian J Clin Biochem.* 2007 Sep; 22(2):140-4.

14. Srivastava S, Natsu S M, Gupta A, Pal K A, Singh U, Agarwal G G, Singh U, Goel M M, Srivastava A N. Lipid peroxidation and antioxidants in different stages of cervical cancer: Prognostic significance. *Indian J Cancer* 2009, 46:297-302.
15. Liu X, Wang A, Lo Muzio L, Kolokythas A, Sheng S, Rubini C, Ye H, Shi F, Yu T, Crowe DL, Zhou X. Deregulation of manganese superoxide dismutase (SOD2) expression and lymph node metastasis in tongue squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2010 Jul 9, 10:365.
16. Termini L, Longatto A , et al. Deregulated expression of superoxide dismutase-2 correlates with different stages of cervical neoplasia. 2011; *Disease Markers*. 2011, 30: 275-281.
17. Demirci, S., Ozsaran, Z., Celik, H. A., Aras, A. B., Aydin, H. H. The interaction between antioxidant status and cervical cancer: a case control study. *Tumori*. 2011, 97: 290-295.
18. Bin Jiang & Songshu Xiao & Md. Asaduzzaman Khan & Min Xue. Defective antioxidant systems in cervical cancer. *Tumor Biol.* (2013) 34:2003–2009.
19. Kasapovic J, Pejic S, Todorovic A, Stojiljkovic V, Pajovic SB. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages. *Cell Biochem Funct.* 2008, 26: 723-730.
20. Robbins D, Zhao Y. Manganese Superoxide Dismutase in Cancer Prevention. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Jul 18. DOI: 10.1089/ars.2013.5297.

21. Termini L1, Maciag PC, Soares FA, Nonogaki S, Pereira SM, Alves VA, Longatto-Filho A, Villa LL. Analysis of human kallikrein 7 expression as a potential biomarker in cervical neoplasia. *Int J Cancer*. 2010 Jul 15;127(2):485-90.

**Table 1.** Expression of SOD2 protein according to the histological diagnosis cervical

Expression of SOD2	Diagnosis				
	Cervicitis n (%)	CIN 1 n (%)	CIN 2 n (%)	CIN 3 n (%)	Carcinoma n (%)
Negative	42 (61.8)	9 (42.9)	22 (33.9)	29 (33.0)	3 ( 8.6)
Weak	2 ( 2.9)	8 (38.1)	14 (21.5)	19 (21.6)	6 (17.1)
Moderate	22 (32.4)	4 (19.1)	20 (30.8)	27 (30.7)	10 (28.6)
Intense	2 ( 2.9)	0 ( - )	9 (13.9)	13 (14.8)	16 (45.7)
Total	68	21	65	88	35

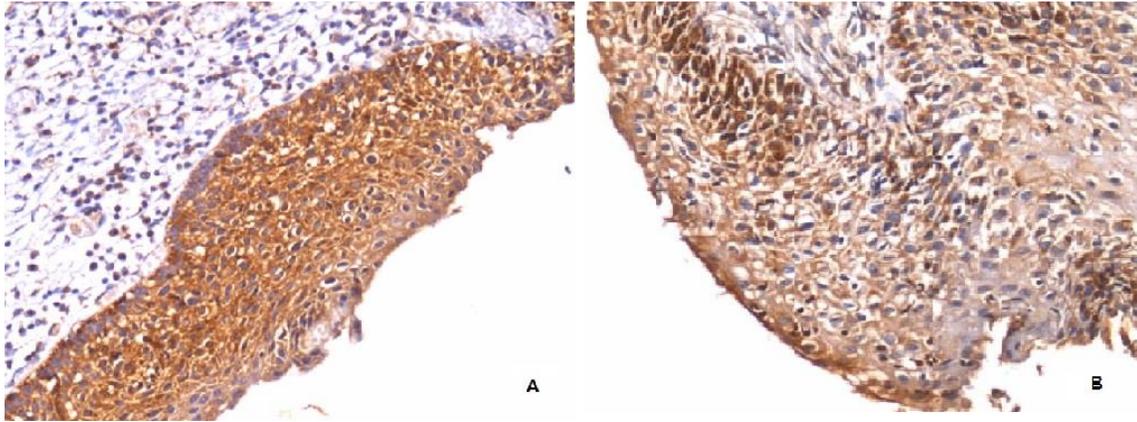
**Table 2.** Association of SOD2 expression positive and of any intensity with intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix

Diagnosis	Expression SOD2		Total	OR (CI95%)	OR (CI95%)
	Positive* n (%)	Negative n (%)			
Carcinoma	32 (91.4)	3 ( 8.6)	35	14.32 (4.08-50.26)	5.33 (1.56-18.25)
CIN 2/ CIN 3	102 (66.7)	5 (33.3)	153	2.64 (1.57- 4.60)	Reference
Cervicitis/ CIN 1	38 (42.7)	51 (57.3)	89	Reference	–

\*. Positive: included weak, moderate and intense expression.

**Table 3.** Association of expression of SOD2 intense with intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix

Diagnosis	Expression of SOD2		Total	OR (CI95%)	OR (CI95%)
	Intensa n (%)	Negative/ Weak/ moderate n (%)			
Carcinoma	16 (45.7)	19 (54.3)	35	36.63 (7.76-172.85)	5.01 (2.24-11.20)
CIN 2/ CIN 3	22 (14.4)	131 (85.6)	153	7.31 (1.68-31.86)	Reference
Cervicitis/ CIN 1	2 ( 2.3)	87 (97.8)	89	Reference	–



**Legends:**

**Fig. A:** Tissue of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) with intense SOD2 expression for the immunohistochemical assay. Original magnification 400x.

**Fig. B:** Tissue of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) with mild to SOD2 expression in immunohistochemical assay. Original magnification 400x.

## 5. Conclusões

---

A expressão de SOD2 é mais frequentemente observada na NIC2/NIC3 e no carcinoma escamoso do que no tecido normal/NIC1, como também a expressão é mais frequentemente observada no carcinoma do que na NIC2/NIC3.

A expressão intensa de SOD2 está fortemente associada a carcinoma escamoso do colo útero em relação à NIC2/NIC3 e ao tecido normal/NIC1.

## 6. Referências Bibliográficas

---

1. Zeferino LC, Derchain SF. Cervical cancer in the developing world. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2006, 20:339-54.
2. [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site+/home+/noticias/2013/inca\\_ministerio\\_saude\\_apresentam\\_estimativas\\_cancer\\_2014](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site+/home+/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014). Acesso em: 10 fev 2014.
3. Bulten J, Horvat R, Jordan J, Herbert A, Wiener H, Arbyn M. European guidelines for quality assurance in cervical histopathology. *Acta Oncol.* 2011; Jun;50(5):611-20.
4. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003, 88:63-73.
5. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003; 89:101-5.
6. Villa LL, Termini L. Biomarcadores na triagem do câncer do colo uterino. *DST – J bras Doenças Sex Transm.* 2008; 20:125-31.

7. Termini L, Filho AL, Maciag PC, Ettinger D, Alves VA, Nonogaki S et al. Deregulated expression of superoxide dismutase-2 correlates with different stages of cervical neoplasia. *Disease Markers*. 2011; 30 (2011) 275-81.
8. Winer R, Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM, et al. Development and Duration of Human Papillomavirus Lesions, after Initial Infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2005; 191:731–8.
9. D’Ottaviano MGL, Zeferino L, Cecatti JG, Terrabuio DR, Martiinez EZ; Prevalence of cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma based on cytological screening in the region of Campinas, São Paulo, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2004, vol. 20 (1):153-9.
10. Snijders PJF, Steenbergen RDM, Heideman DA, Meijer CJ. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *Journal of Pathology*. 2006; 208:152-64.
11. Oikonomopoulou K, Diamandis EP, Hollenberg MD. Kallikrein-related peptidases: proteolysis and signaling in cancer, the new frontier.. *Biol Chem*. 2010; Apr; 391(4):299-310.
12. Termini L, Boccardo E, Esteves GH, Hirata R Jr, Martins WK, Colo AE et al. Characterization of global transcription profile of normal and HPV-immortalized keratinocytes and their response to TNF treatment. *BMC Med Genomics*. 2008;Jun 27;1:29.
13. Hitchler MJ, Wikainapakul K, Yu L, Powers K, Attatippaholkun W, Domann FE. Epigenetic Regulation of Manganese Superoxide Dismutase Expression in Human Breast Cancer Cells. *Epigenetics*. 2006, 1 (4): 163-171.
14. Srinivas PR, Kramer BS, Srivastava S. Trends in biomarker research for cancer detection. *Lancet Oncol*. 2001; 2(11): 698-704.

15. Po-Ming Chen, Tzu-Chin Wu, Yao-Chen Wang, Ya-Wen Cheng, Gwo-Tarn Sheu, Chih-Yi Chen et al. Activation of NF- $\kappa$ B by SOD2 promotes the aggressiveness of lung adenocarcinoma by modulating NKX2-1-mediated IKK $\beta$  expression. *Carcinogenesis*.2013; .34: 11, p.2655–63.
16. Gallagher CJ, Ahn K, Knipe AL, Dyer AM, Richie JP, Lazarus P, Muscat JE. Association between haplotypes of manganese superoxide dismutase (SOD2), smoking, and lung cancer risk. *Free Radic Biol Med*. 2009; 46:20-24.
17. Xu Y, Fang F, Dhar SK, Bosch A, St Clair WH, Kasarskis EJ et al. Mutations in the SOD2 promoter reveal a molecular basis for an activating protein 2-dependent dysregulation of manganese superoxide dismutase expression in cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2008; 6:1881-93.
18. De Marco F, Bucaj E, Foppoli C, Fiorini A, Blarzino C, Filipi K et al. Oxidative stress in HPV-driven viral carcinogenesis: redox proteomics analysis of HPV-16 dysplastic and neoplastic tissues. *PLoS One*. 2012; 7(3):e34366. doi: 10.1371/journal.pone.0034366. Epub 2012 Mar 28.
19. Oshima H, Bartsch H. Chronic infection and inflammatory process as cancer risk Factors: Possible role of nitric oxidative in carcinogenesis. *Mutat Res*. 1994; 305:253-64.
20. Liu X, Wang A, Lo Muzio L, Kolokythas A, Sheng S, Rubini C et al. Deregulation of manganese superoxide dismutase (SOD2) expression and lymph node metastasis in tongue squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2010,Jul 9;10:365.
21. Xu Z, Zhu H, Luk JM, Wu D, Gu D, Gong W et al. Clinical significance of SOD2 and GSTP1 gene polymorphisms in Chinese patients with gastric cancer. *J Cancer*. 2012 Apr 19; doi: 10.1002/cncr.27599.

22. Hempel N, Carrico PM, Melendez JA. Manganese superoxide dismutase (Sod2) and redox-control of signaling events that drive metastasis. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011 Feb;11(2):191-201.
23. Balasubramaniyan N, Subramanian S, Govindasamy S. Status of antioxidant systems in human carcinoma of uterine cervix. *Cancer Lett.* 1994;87:187–92.
24. Williams VM, Filippova M, Soto U, Duerksen-Hughes PJ. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol.* 2011 Jan; 6 (1): 45-57.
25. Naidu MS, Suryakar AN, Swami SC, Katkam RV, Kumbar KM. Oxidative stress and antioxidant status in cervical cancer patients. *Indian J Clin Biochem.* 2007 Sep; 22(2):140-4.
26. Srivastava S, Natu SM, Gupta A, Pal KA, Singh U, Agarwal GG et al. Lipid peroxidation and antioxidants in different stages of cervical cancer: Prognostic significance. *Indian J Cancer.* 2009; 46:297-302.
27. Kasapovic J, Pejic S, Todorovic A, Stojiljkovic V, Pajovic SB. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages. *Cell Biochem Funct.* 2008; 26: 723-30.
28. Jiang B, Xiao S, Khan MA, Xue M. Defective antioxidant systems in cervical câncer. *Tumor Biol.* 2013; 34:2003–9.
29. Demirci S, Ozsaran Z, Celik HA, Aras AB, Aydin HH. The interaction between antioxidant status and cervical cancer: a case control study. *Tumori.* 2011; 97: 290-5.
30. Kacakci A, Aslan I, Toplan S, Oysu C, Aslan O, Aydemir B. Significance of the counteracting oxidative and antioxidative systems in the pathogenesis of laryngeal carcinoma. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009; 38: 172-7.

31. Termini L1, Maciag PC, Soares FA, Nonogaki S, Pereira SM, Alves VA, Longatto-Filho A, Villa LL. Analysis of human kallikrein 7 expression as a potential biomarker in cervical neoplasia. *Int J Cancer*. 2010 Jul 15;127(2):485-90.

# 7. Anexos

## 7.1. Anexo 1 – Ficha para coleta de dados

<b>I. Identificação</b>	<b>Ficha:</b>  _ _ _
<b>HC:</b>  _ _ _ _ _ _ _ _	
<b>Iniciais:</b>	<b>Data da Coleta:</b>  _ _ _ _ _ _ _

NI = Não informado

NS = Não sabe

<b>Ficha:</b>	_ _ _			
<b>Idade:</b>	_ _  anos  _ _  meses			
<b>Idade na primeira relação sexual:</b>	_ _			
<b>Nº de parceiros:</b>	_ _			
<b>Uso de anticoncepcional:</b>	_  sim	_  Não	<b>Tempo de uso:</b>	
<b>Último resultado do teste de Papanicolaou:</b>	_  Normal	_  Anormal		
<b>Estado menstrual:</b>	_  menacme	_  menopausada		
<b>HIV:</b>	_  positiva	_  negativa	_  NI	_  NS
<b>Tabagismo:</b>	_  sim	_  não		
Há quanto tempo:	_____	Cigarros ao dia	_ _	
Fumou por quanto tempo:	_____			
Contato com fumante em casa:	_  sim	_  Não		

### Resultados:

#### 1. Diagnóstico Histológico:

- Negativo
- NIC 1       NIC 2       NIC3
- Carcinoma escamoso
- Adenocarcinoma *in situ*
- Adenocarcinoma invasor

#### 2. Expressão de SOD2 diagnóstico histológico:

- Negativo/ fracamente positiva (< 10% de células coradas)
- Moderada positividade (10% a 50% de células coradas)
- Intensa positividade (>50% de células coradas)

## 7.2. Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido

### **AValiação da expressão da proteína superóxido desmutase 2 como biomarcador de neoplasias do colo do útero**

Eu, Sra \_\_\_\_\_, atendida no Hospital da Mulher Prof. José Aristodemo Pinotti (CAISM) no ambulatório de patologia do trato genital inferior e colposcopia fui convidada a participar desta pesquisa porque o resultado do meu exame de prevenção (colpocitologia oncológica) mostrou alterações das células do colo do útero, a partir do qual foi indicado uma cirurgia de alta frequência. Sei que responderei a um questionário sobre informações pessoais mantendo meu anonimato (serão avaliadas somente pela pesquisadora responsável) e que as fichas ficarão de posse do(s) Doutor(es) responsáveis pela pesquisa, a biomédica Mariana Genaro Burger, Dr. Luiz Carlos Zeferino e Dra. Silvia Helena Rabelo dos Santos, que manterão o sigilo da fonte destas informações.

Fui informada que a pesquisa trata de tentar identificar marcadores capazes de prever lesões através da citologia cervical, a partir de amostras de células do colo do útero, coletadas antes do procedimento de cirurgia de alta frequência, necessário para o diagnóstico e tratamento da minha doença. Sei que para esta pesquisa serão coletados esfregaços para lâminas para exame citológico do colo do meu útero. Os procedimentos serão realizados pelo médico do ambulatório do qual sou paciente, não interferirá em meu tratamento e não implicará em manipulação adicional de partes do meu corpo além daquelas já necessárias para o tratamento. Essas amostras em lâminas serão estocadas por diferentes períodos de tempo. Também fui informada de que os resultados obtidos através desta pesquisa têm finalidade apenas para avaliação de técnicas laboratoriais, ou seja, não terei benefício clínico imediato para mim. Sei que ao voltar ao ambulatório para receber os resultados dos meus exames serei tratada de acordo com a necessidade da minha doença. Autorizo o Dr. Luiz Carlos Zeferino e a pesquisadora Mariana Genaro Burger a realizar uma cópia dos resultados dos exames de laboratório para que sejam anexados às fichas de pesquisa. Estou ciente de que o material biológico referente a esta pesquisa ficará sob a guarda do Laboratório Clínico Especializado do CAISM, sob responsabilidade direta do Dr. Luiz Carlos Zeferino. Sei

que não serei paga para participar deste estudo e não receberei ressarcimento para este mesmo fim.

Fui esclarecida quanto ao meu direito de não participar da pesquisa e de ser atendida no ambulatório sempre que necessário. A não aceitação na participação no estudo não implicará na perda dos direitos iniciais rotineiramente oferecidos pelo ambulatório. Em caso de dúvidas ou esclarecimento, tenho o direito de telefonar para a pesquisadora Mariana Genaro Burger ou Dr. Luiz Carlos Zeferino no número (19) 3521-9305 ou para o Comitê de ética da UNICAMP no número (19) 3521-8936.

Paciente \_\_\_\_\_

Campinas, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2012.

Pesquisadora \_\_\_\_\_

## 7.3. Anexo 3 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** Avaliação da expressão das proteínas caliceína e superóxido desmutase 2 como biomarcadores de neoplasia do colo do útero

**Área Temática:**

**Pesquisador:** Luiz Carlos Zeferino

**Versão:** 1

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

**CAAE:** 04098512.5.0000.5404

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Número do Parecer:** 62828

**Data da Relatoria:** 24/07/2012

#### Apresentação do Projeto:

Introdução: Os biomarcadores são indicadores do estado fisiológico e de alterações que ocorrem durante o processo neoplásico. A expressão de caliceína (hK7) e superóxido desmutase (SOD2) está presente no carcinoma do colo do útero, especialmente na metástase e invasão do tumor. Os níveis de hK7 e SOD2 aumentam com a gravidade da lesão e sugerem que estas proteínas podem ser úteis como biomarcadores de severidade de neoplasia cervical. Objetivo: Avaliar a variabilidade da expressão das proteínas hK7 e SOD2 em função da severidade das lesões do epitélio do colo uterino em esfregaços cervicais e cortes histológicos, em mulheres com indicação de cirurgia de alta frequência (CAF). Metodologia: O desenho do estudo será do tipo corte transversal e teste diagnóstico, com 225 mulheres indicadas para conização por CAF. Serão colhidos dois esfregaços, de modo que, um será para exame citológico realizado através de método convencional e outro para reação de imunocitoquímica. As amostras resultantes da conização por CAF serão incluídas em blocos de parafina, os quais serão separados para realização do ensaio imunocitoquímico. A expressão proteica de hK7 e SOD2 será pesquisada através de ensaios imunocitoquímicos e imunocitoquímicos. Os esfregaços citológicos submetidos à imunocitoquímica serão categorizados como positivos ou negativos com base no aparecimento de agrupamentos celulares mostrando coloração marrom. Uma expressão de mais de 50% as proteínas hK7 e SOD2 nos cortes histológicos será categorizado como positivo. A magnitude da associação entre duas variáveis categóricas será obtida através do cálculo do odds ratio (OR), com intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a variabilidade da expressão das proteínas caliceína (hK7) e superóxido desmutase-2 (SOD2) em função da severidade das neoplasias do epitélio do colo uterino em esfregaços cervicais e na biopsia de mulheres indicadas para conização por Cirurgia de Alta Frequência (CAF).

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há.

Benefícios:

Tamanho da Amostra no Brasil: 225

Os biomarcadores podem ser importantes na qualificação do diagnóstico da neoplasia do colo do útero. Do ponto de vista clínico, a possível identificação de marcadores referentes à proliferação celular que permitam prever o comportamento das lesões neoplásicas, poderá ser importante para indicar as mulheres que devem ser submetidas a condutas mais agressivas ou indicar aquelas nas quais

ser adotada com mais segurança. Além disso, a aplicabilidade dos biomarcadores poderia ser na complementação de resultado de exames de triagem na identificação de lesões cervicais com diagnósticos limítrofes, ou na redução dos riscos de resultados falso-negativos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto apresenta-se bem escrito seguindo as recomendações metodológicas adequadas. Apresenta critérios de inclusão, exclusão e descontinuação bem definidos. Cálculo do tamanho amostral e análise estatística bem descritos. Os aspectos éticos estão devidamente discutidos e o TCLE adequado para o tipo de estudo. O presente projeto contém todos os itens necessários para aprovação

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

TCLE e orçamento apresentados de forma adequada.

**Recomendações:**

Não há

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Conforme discussão em reunião do colegiado em 24/07/2012.

CAMPINAS, 30 de Julho de 2012

---

Assinado por:  
Carlos Eduardo Steiner

## 7.4. Anexo 4: Parecer da Comissão de Pesquisa



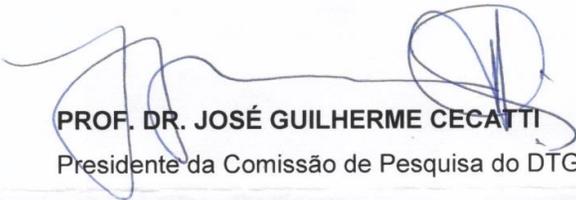
Comissão de Pesquisa do DTG / CAISM

Campinas, 14 de maio de 2012.

Protocolo nº: 009/2012

O protocolo de pesquisa "*Avaliação da proteína calicreína como biomarcador preditor de lesão de alto grau, em citologia cervical*", da pesquisadora Mariana Genaro Burger, orientada pelo Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino, foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do DTG/CAISM em 14/05/2012.

Atenciosamente,



**PROF. DR. JOSÉ GUILHERME CECATTI**

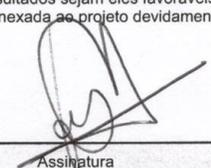
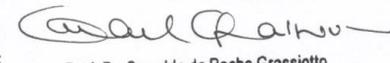
Presidente da Comissão de Pesquisa do DTG/CAISM

---

Rua Alexander Flemming, n.º101 – Cidade Universitária Zeferino Vaz – Campinas-SP  
Fone: (19) 3521-9400  
comissaopesquisa@caism.unicamp.br



## FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: Avaliação da expressão das proteínas calicreína e superóxido desmutase 2 como biomarcadores de neoplasia do colo do útero		2. CAAE:	
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 4. Ciências da Saúde			
<b>PESQUISADOR RESPONSÁVEL</b>			
5. Nome: Luiz Carlos Zeferino			
6. CPF: 959.316.198-87		7. Endereço (Rua, n.º): SANTA MARIA ROSSELO MANSOES SANTO ANTONIO nº 905 - Apto. 22A CAMPINAS SAO PAULO 13087503	
8. Nacionalidade: BRASILEIRA		9. Telefone: (19) 3521-9516	10. Outro Telefone:
11. Email: zeferino@fcm.unicamp.br			
12. Cargo:			
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.			
Data: 30 / 05 / 2012		 Assinatura	
<b>INSTITUIÇÃO PROPONENTE</b>			
13. Nome: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP		14. CNPJ:	15. Unidade/Orgão: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM
16. Telefone: (19) 3521-9300		17. Outro Telefone:	
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Responsável:  Prof. Dr. Oswaldo de Rocha Grassiotto Superintendente / Diretor Executivo		CPF: 834.806.688-87	
Cargo/Função: Hospital da Mulher Prof. Dr. José A. Pinotti CRM: 30.779 - Matr. 05072-5 - CAISM/UNICAMP			
Data: 30 / 05 / 2012		 Assinatura	
<b>PATROCINADOR PRINCIPAL</b>			

18. Nome: 5560 Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo ((FAPESP))		19. Telefone:	20. Outro Telefone:
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.			
Nome: _____		CPF: _____	
Cargo/Função: _____		Email: _____	
Data: ____ / ____ / ____		 Assinatura	