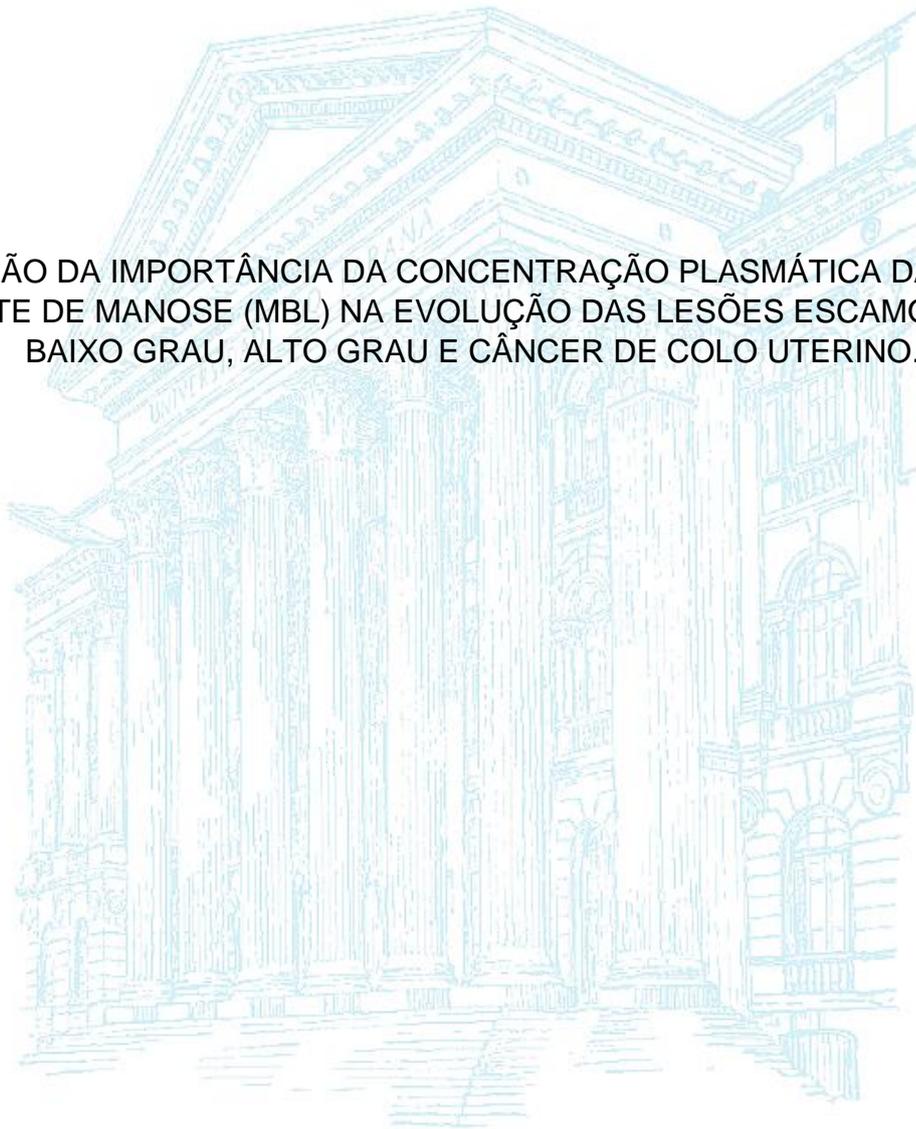


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – UFPR

CARLOS AFONSO MAESTRI

AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DA LECTINA
LIGANTE DE MANOSE (MBL) NA EVOLUÇÃO DAS LESÕES ESCAMOSAS DE
BAIXO GRAU, ALTO GRAU E CÂNCER DE COLO UTERINO.



CURITIBA
2014

CARLOS AFONSO MAESTRI

Avaliação da importância da concentração plasmática da lectina ligante de manose (MBL) na evolução das lesões escamosas de baixo grau, alto grau e câncer de colo uterino.

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Interna e Ciências da Saúde.

Orientador-
Prof. Dr. Newton Sérgio Carvalho

Co-orientadores-
Prof. Dr. Renato Mitsunori Nisihara,
Prof. Dra. Maria da Graça Bicalho,
Prof. Dra. Iara Taborda Messias Reason.

CURITIBA
2014



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA
= MESTRADO e DOUTORADO =

PARECER

Aos vinte e um dias do mês de novembro do ano de dois mil e quatorze, a banca examinadora constituída pelos Professores Doutores: **Iara Moreno Linhares, Maria da Graça Bicalho e Newton Sérgio de Carvalho**, exarou o presente parecer sobre a dissertação elaborada por **Carlos Afonso Maestri**, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, nível Mestrado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: “**AVALIACÃO DA IMPORTÁNCIA DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DA LECTINA LIGANTE DE MANOSE (MBL) NA EVOLUÇÃO DAS LESÕES ESCAMOSAS DE BAIXO GRAU, ALTO GRAU E CÂNCER DE COLO UTERINO**”. A Banca examinadora considerou que **Carlos Afonso Maestri**, apresentou trabalho adequado para dissertação e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina Interna** e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Curitiba, 21 de novembro de 2014.

Profa. Dra. Iara Moreno Linhares

Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho

Prof. Dr. Newton Sérgio de Carvalho

Dedicatória.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, pela educação e formação moral que serviram de base para minha vida.

Aos meus filhos que são o estímulo para lutar por um mundo melhor.

A minha amada esposa por ser sempre companheira e me apoiar.

Aos meus professores pela paciência e abnegação.

As minhas pacientes, que confiam em meu trabalho e dedicação a medicina.

Carlos Afonso Maestri

AGRADECIMENTOS

A realização de teses e dissertações são trabalhos que envolvem esforços múltiplos e isso só é possível por que muitas pessoas colaboram e nos ajudam. Esta dissertação tem um autor, mas tem muitos outros colaboradores.

Agradeço ao professor Juarez Gabardo que me orientou e ensinou estatística,

A professora Iara Taborda Messias Reason que me abriu inúmeras possibilidades de pesquisa, no Laboratório de Imunopatologia, do Hospital de Clínicas da UFPr.

Ao Professor Renato Nishiara dedicado pesquisador e orientador.

Aos Colegas que me ajudam diariamente nos atendimentos destes pacientes Dra. Fernanda Fonseca, Dr. Roberto Maluf, Dra. Sabrina Godoy.

A toda equipe do Laboratório do Hospital Erasto Gaertner que me auxiliou nas coletas.

Ao Dr. Guilherme P. Ramos que nos ajudou nos trabalhos preliminares.

A Patrícia Baby minha leal secretária que sempre facilita minha vida.

Agradeço ao professor Hélio Teive e ao PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA, por ter acreditado nas possibilidades da minha pesquisa.

Agradeço ao governo brasileiro e a UFPr que me propiciaram essa oportunidade de educação, que em outros países jamais seria concedida.

Agradeço de forma bastante especial ao Dr. Newton Sérgio Carvalho, um dos maiores professores que tive a satisfação de conhecer, não só agradeço a orientações mas principalmente os exemplos de conduta profissional e ética que me deu.

RESUMO

Introdução- As lesões associadas com a infecção pelo HPV podem evoluir para lesões pré malignas como as neoplasias intraepiteliais cervicais(NIC) e câncer de colo uterino(CC). Suspeitamos que alguma falha no sistema imune permita a persistência do vírus. Neste estudo foi avaliado de forma transversal a concentração de (MBL) Lectina Ligante de Manose, uma ficolina que atua na via das lectinas do sistema complemento e para se avaliar a hipótese que poderia estar envolvida na evolução da doença.

Método- As pacientes atendidas no serviço de Patologia do Trato Genital Inferior do Hospital Erasto Gaertner em 2011, (Hospital do Câncer) foram triadas de acordo com o grau de doença em NIC1, NIC2, NIC3 e Câncer. Foi coletado sangue para exames de rotina e dosagem da concentração de MBL.

Resultado- Foram avaliados 364 pacientes distribuídas em NIC1=54, NIC2=72, NIC3=145 e CC = 93. A média de idade foi distinta entre os grupos sendo NIC1(30,6), NIC2(34,4), NIC3(34,3), e CC(48,3). A mediana das concentrações de MBL foram NIC1(1324), NIC2(1104), NIC3(1098), e CC(1452).

Conclusão- Os resultados encontrados, não sustentam a hipótese de que níveis de MBL podem influenciar a infecção ou evolução da doença no colo uterino. Também demonstraram que a concentração não variou com a idade das pacientes estudadas.

Palavras-chave: MBL, Papiloma vírus Humano, HPV, Câncer de colo uterino, imunidade.

ABSTRACT

Background

The lesions associated with HPV infection can progress to pre malignant lesions such as cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical cancer (CC). We suspect a fault in the immune system is what allows the virus persistence. This study evaluated transversely the concentration of Mannose Binding Lectin (MBL) that operates in the ficolin and lectin pathway of the complement system to evaluate the hypothesis that MBL could be involved in the disease progression.

Method

Patients treated in the Hospital in 2011 (Cancer Hospital) were screened according to the degree of disease in CIN1, CIN2, CIN3 and Cervical Cancer. The blood was collected and tested, for standard blood tests and concentration of MBL.

Results

We evaluated 364 patients distributed in CIN1=54, CIN2=72, CIN3=145 CC=93 were evaluated. Mean age was different among the groups being CIN1 (30.6), CIN2 (34.4), CIN3 (34, 3), and CC (48.3). The median MBL concentrations were CIN1 (1324), CIN2 (1104), CIN3 (1098), and CC (1452).

Conclusion

The results do not support the hypothesis that MBL levels may influence the progress of the disease or infection in the cervix. The results also demonstrated that the concentration did not vary with age of the patients studied.

Keywords: MBL, human papillomavirus, HPV, Cervical cancer, immunity.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 –	
Tipo de HPV e doença associada	25
Quadro 2-	
Células e moléculas solúveis do sistema imunológico	34
Tabela 1-	
Resumo da história natural da NIC.	28
Tabela 2 –	
Valores das média etária e medianas de concentração em ng/ml e número de Casos.	46
Tabela 3 –	
Valores das médias e medianas em ng/ml e número de casos.	47
Tabela 4 –	
Comparativo da concentração da MBL das 25% mais jovens com as 25% mais Idosas de cada grupo.	48

LISTA DE ILUSTRAÇÕES (FIGURAS E GRÁFICOS)

Figura 1	
Incidência e Mortalidade de Câncer nas Capitais Brasileiras-----	22
Figura 2	
Estrutura esquemática do HPV -----	26
Figura 3	
História evolutiva do Câncer de colo uterino. -----	29
Figura 4	
Mecanismo da carcinogênese por HPV -----	30
Figura 5	
Origem das diversas linhagens de células do Sistema Imunológico -----	34
Figura 6	
Resposta do sistema imune inato -----	36
Figura 7	
Esquema resumido da ativação do sistema complemento. -----	40
Gráfico 1	
Concentração de MBL separadas por estágio de doença. -----	46
Gráfico 2	
Frequência de pacientes com produção de MBL maior e menor que 500g/ml. --	47
Gráfico 3	
Frequência de distribuição de casos com produção superior a 1000ng/ml e inferior a 100ng/ml. -----	48
Gráfico 4	
Comparativo do total concentrações de MBL entre as 25% mais jovens e as 25% mais idosas de cada grupo. -----	49
Figura 8	
Dosagem de MBL pelo método TRIFMA -----	51

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	
Dosagem e Quantificação da MBL Sérica por <i>TRIFMA</i> (Ensaio Imunofluorométrico a tempo resolvido). -----	69
ANEXO 2	
Primeira emenda do projeto acrescentando o grupo com câncer. -----	70
ANEXO 3	
Segunda emenda do projeto autorizando que exames possam ser feitos na Dinamarca. -----	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α - Alfa

% - Porcentagem

°C - Graus Celsius

μ l - Microlitro

χ^2 - Teste do qui-quadrado

Ac - Anticorpo

AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida

AIS - Adenocarcinoma in situ

ANOVA- Análise de variância

APC – Célula apresentadora de antígeno

C1, C2, C3 e C4 - componentes do sistema complemento

CC - Carcinoma Cervical , câncer de colo uterino

CCR - Câncer colorretal

CD4+ - Células T subpopulação linfocitária 4

CD8+ - Células T subpopulação linfocitária 8

CLM - Complexo Lítico de Membrana

CO – Contraceptivos orais

CO₂ - Gás carbônico

CPH - Complexo Principal de Histocompatibilidade

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DTTA - Ácido diethylenetriaminetetraacetic

E - Região precoce do vírus HPV

E6, E7- oncogenes virais

ELISA - Enzyme linked immuno sorbent assay

EUA - Estados Unidos da América

Globocan – Projeto da OMS que tem como objetivo fornecer estimativas contemporâneas da incidência de, mortalidade e prevalência dos principais tipos de cânceres, a nível nacional, para 184 países.

HIV - Vírus da imunodeficiência Humana

HPV - Papiloma vírus humano
HR - Tipos de HPV de alto risco
HSIL - Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
IARC - International Agency of Research in Cancer
IC - Intervalo de confiança
IFN – Interferon
IFN- γ Interferon - gama
Ig – Imunoglobulina
IgA- Imunoglobulina A
IgG Imunoglobulina G
IL – Interleucina
INCA – Instituto Nacional do Câncer
L- Região tardia do genoma do vírus HPV
LR - Tipos de baixo risco
LSIL - Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
MAC - Membrane Attack Complement
MASP - 1, MASP - 2 e MASP - 3 - Proteases da Serina associadas a MBL
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
MS – Ministério da saúde
NIC – Neoplasia intraepitelial cervical
NK – Natural killers
nm - Nanômetros
NO - Óxido nítrico
p53 – Gene supressor tumoral
pb - Pares de base
PCR - Reação em cadeia da polimerase
Pg - Picogramas
pH - Potencial de hidrogênio
pRb – Proteína do retinoblastoma, proteína supressora de tumores
RRP - Receptores de Reconhecimento de Padrões
SIDA - Síndrome da imunodeficiência humana adquirida
sp - Espécies
SUS – SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE
TCR – Receptor de célula T

TGF- β Fator de transformação do crescimento beta

TLR- Receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos e são expressos em células imunes e não imunes.

TLR4 - Toll-like receptor 4

TNF- α - Fator de necrose tumoral - alfa

UFPr – Universidade Federal do Paraná

URR- Região reguladora do Vírus HPV

VLP- “Virus like particule”, partícula semelhante ao vírus.

VL-Via das Lectinas

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION

Sumário

Resumo	VII
Abstract	VIII
Lista de tabelas quadros	IX
Lista de Ilustrações	X
Anexos	XI
Lista de abreviaturas e siglas	XV
1 Introdução	20
2 Revisão da literatura	21
2.1 Carcinoma de colo uterino e suas lesões precursoras	21
2.1.1. Conceito	21
2.1.2 Epidemiologia.....	21
2.1.3 Importância da histopatologia e classificação citológica.....	23
2.1.4 Fatores de risco	24
2.2. Papilomavírus humano	25
2.2.1. História natural e ciclo de vida do HPV.....	28
2.2.2. Oncogênese do HPV	30
2.2.3. Resposta imune do hospedeiro contra o HPV.....	32
2.2.4. Mecanismos de fuga do vírus HPV do sistema imunológico	34
2.2.5. Vacinação e a resposta vacinal contra HPV	34
2.2.6. Mecanismos de proteção induzida pela vacina	35
2.2.7 Imunidade inata e adaptativa	35
2.3 Sistema complemento	38
2.3.1. Via clássica	39
2.3.2. Via alternativa	41
2.3.3. Via das lectinas	42
2.4. MBL	44
2.4.1 Evidências de interação com HPV	45
3 Justificativa	47
4 Objetivos	48
5 Método	49
5.1 Caracterização da amostra.....	49

5.2. Metodologia	49
5.3 Análise estatística.....	51
6. Resultados	52
7. Discussão	56
8. Conclusão	59
9. Referências	60
10. Anexos	68

1 Introdução

O Câncer de colo uterino (CC), permanece como um grande desafio a ser vencido, pois mesmo tendo sua incidência reduzida em países desenvolvidos, regiões no mundo com baixo poder econômico tem nesta moléstia um grande algoz. O uso da citologia oncológica, exame de Papanicolau, tem sido uma estratégia universalmente aceita e fez com que a incidência de câncer do colo do útero e mortalidade nos Estados Unidos diminuísse significativamente desde a década de 1950 por mais de 70% (Safaeian M, 2007), (Landis SH, 1999). Esse declínio é atribuído principalmente à introdução do teste de Papanicolau na década de 1940. O câncer do colo do útero que nos EUA foi a principal causa de mortes por câncer nas mulheres, agora está em 12^o lugar (Solomon D, 2000). Apesar disso, o câncer do colo do útero é o segundo mais frequente de todas as doenças malignas do sexo feminino em todo o mundo, sendo que 80% dos casos ocorrem em países pobres sem recursos (Bosch XF, 2013) (Safaeian M, 2007) (Doorslaer KV, 2010). O resultado da implementação de programas de rastreamento citológico organizados e bem coordenados pode ser também vista com os dados da Escandinávia e Inglaterra que conseguiram diminuir acima dos 50 % a incidência e mortalidade do câncer de colo uterino (Safaeian M, 2007) (Parkin DM, 2005) (Kitchener HC, 2006). Entretanto a citologia por si só não é suficiente para predizer quem serão os casos que evoluirão para câncer de colo de útero, e apresenta índice de falsos negativos consideráveis. (INCA, Programa Nacional de Controle Cancer Colo Utero, 2014).

2 Revisão da literatura

2.1 Carcinoma de colo uterino e suas lesões precursoras

2.1.1. Conceito

O câncer do colo do útero é caracterizado pela replicação desordenada das células do epitélio de revestimento do órgão, comprometendo o tecido subjacente (estroma) e podendo invadir estruturas e órgãos contíguos ou à distância. Há duas principais categorias de carcinomas invasores do colo do útero, dependendo da origem do epitélio comprometido: o carcinoma epidermoide, tipo mais incidente e que acomete o epitélio escamoso (representa cerca de 80% dos casos), e o adenocarcinoma, tipo mais raro (menos frequente) e que acomete o epitélio glandular (10% dos casos).

É uma doença de desenvolvimento lento, que pode cursar sem sintomas em fase inicial e evoluir para quadros de sangramento vaginal intermitente ou após a relação sexual, secreção vaginal anormal e dor abdominal associada com queixas urinárias ou intestinais nos casos mais avançados. (INCA, Programa Nacional de Controle Cancer Colo Utero, 2014)

2.1.2 Epidemiologia

Cerca de 250.000 mortes por ano no mundo, diretamente relacionada com o câncer de colo uterino, além disso outras doenças relacionadas a infecção do vírus HPV com grande morbidade, como câncer de ânus, vagina vulva, pênis, cabeça e pescoço podem acometer homens e mulheres (Doorbar J, 2012) (Doorslaer KV, 2010) (Bosch XF, 2013).

Segundo o Globocan, cerca de 85% dos casos de câncer do colo do útero ocorrem nos países menos desenvolvidos e a mortalidade por este câncer varia de 18 vezes entre as diferentes regiões do mundo, com taxas de menos de 2 por 100.000 na Ásia Ocidental e de 27,6 na África oriental (WHO, 2014).

Nos Estados Unidos da América(EUA), o risco de desenvolver o CC é de aproximadamente 0,7 % no decorrer da vida e estima-se que em 2014 teremos 12.360 casos novos e 4.020 óbitos por CC (NCI, National Cancer Institute: Comprehensive

Cancer Information, 2014). O número de novos casos de câncer de colo do útero foi de 7,8 por 100.000 mulheres por ano. O número de mortes foi de 2,4 por 100.000 mulheres por ano. Tendo-se uma estimativa de 249.632 mulheres que viviam com *câncer de colo do útero nos EUA* (CDC, 2014) .

No Brasil, é o terceiro tumor mais frequente na população feminina, atrás do câncer de mama e do colorretal, e a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil. Prova de que o país avançou na sua capacidade de realizar diagnóstico precoce é que na década de 1990, 70% dos casos diagnosticados eram da doença invasiva. Atualmente 44% dos casos são de lesão precursora do câncer, chamada carcinoma in situ (INCA-Tipos de câncer, 2014).

As taxas de incidência estimada e de mortalidade no Brasil são elevadas quando comparadas às de países desenvolvidos com programas de detecção precoce bem estruturados. Países europeus, Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália apresentam as menores taxas, enquanto países da América Latina e, sobretudo, de regiões mais pobres da África, apresentam valores bastante elevados (INCA, Programa Nacional de Controle Cancer Colo Utero, 2014).

Na análise regional no Brasil, o câncer do colo do útero se destaca como o primeiro mais incidente na região Norte, com 23,6 casos por 100.000 mulheres. Nas regiões Centro-Oeste e Nordeste ocupa a segunda posição, com taxas de 22,2/100 mil e 18,8/100 mil, respectivamente, e é o quarto mais incidente na região Sudeste (10,15/100 mil) e quinto na Sul (15,9/100 mil) (INCA, Programa Nacional de Controle Cancer Colo Utero, 2014).

Várias capitais já apresentam resultados bem promissores que houve um evidente decréscimo nas taxas de incidência e de mortalidade como nas cidades de Curitiba (-9,4% e -7,9%), São Paulo (-7,4% e -3,6%) e Goiânia (-4,9% e -3,2%).

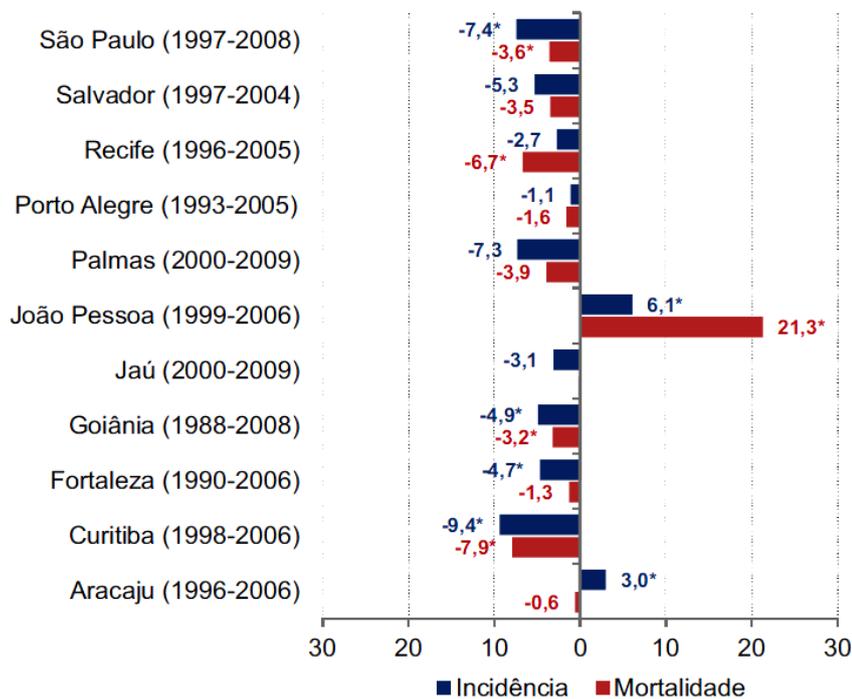


Figura 1- Incidência e Mortalidade de Câncer nas Capitais Brasileiras
Adaptado pelo autor, fonte : (INCA, Informativo vigilância do câncer, 2014)

2.1.3 Importância da histopatologia e classificação citológica

A citologia oncótica ou exame de Papanicolau é a base atual do rastreamento de lesões pré-malignas de um câncer absolutamente evitável como o de colo de útero (Safaeian M, 2007) (Bosch XF, 2013) (Kitchener HC, 2006) (Solomon D, 2000). É o principal método de rastreamento, embora o tecido necrótico, sangramento e células inflamatórias possam prejudicar a visualização de células neoplásicas. A taxa de falso negativo da citologia pode ultrapassar 50%. Assim, um esfregaço negativo em uma paciente sintomática nunca deve ser considerado como resultado definitivo (INCA-Tipos de câncer, 2014).

O câncer do colo do útero é precedido por uma longa fase de doença pré-invasiva, denominada de neoplasia intraepitelial cervical (NIC). A NIC é categorizada em graus I, II e III, dependendo da proporção da espessura do epitélio que apresenta células maduras e diferenciadas. Os graus mais graves da NIC (II e III) apresentam um comprometimento maior na proporção da espessura do epitélio composto de células indiferenciadas (Sellors JW, 2003) e, devido à sua maior probabilidade de progressão para o câncer, se deixadas sem tratamento (McCredie MR, 2008), são consideradas seus reais precursores. A maioria das NIC I regride em períodos entre

12 a 24 meses ou não progride à NIC II ou III e, portanto, não é considerada lesão precursora (Ho GY, 1998).

A infecção persistente, provocada por um ou mais dos tipos oncogênicos de Papiloma vírus humano (HPV), é uma causa necessária da neoplasia cervical, porém, a maioria das alterações cervicais causadas pela infecção do HPV tem pouca probabilidade de progredir (Sellors JW, 2003).

Organizar programas de rastreio nos países em desenvolvimento, onde a incidência do CC é alta mantém-se um grande desafio. Há muitos obstáculos para o rastreio do CC nos países pobres de recursos, geralmente atribuídas à falta de infraestrutura e aporte financeiro na área de saúde - e uma falta de conscientização e educação sobre o câncer do colo do útero entre as mulheres e os profissionais de saúde (Denny L, 2006) (Zeferino LC, 2006) (Safaeian M, 2007) (Safaeian M, 2007). Além disso, na África e na América do Sul que além de suportar uma prevalência maior do câncer do colo do útero, há concorrentes necessidades de cuidados de saúde, tais como HIV / AIDS, doenças infecciosas, como a malária, tuberculose e mortalidade infantil elevada e altas taxas de mortalidade materna que consomem muito dos recursos que normalmente são escassos. Também não há muitos médicos treinados, e há uma falta de suprimentos e pessoal de laboratório adequados, e instalações de tratamento (Solomon D, 2000) (Denny L, 2006) (Zeferino LC, 2006).

2.1.4 Fatores de risco

O principal fator de risco para o câncer de colo uterino seria sem dúvida a infecção do vírus HPV (Doorslaer KV, 2010) (Ho GY, 1998) (Bosch XF, 2013). Outros cofatores também são considerados para o câncer invasivo entre as mulheres infectadas por HPV, como o tabagismo, uso de anticoncepcionais hormonal(CO) a longo prazo, multiparidade e infecção do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Bosch XF, 2013).

O uso de anticoncepcionais orais poderia influenciar a progressão da infecção por promover a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro e estimular a transcrição dos oncogenes virais E6 e E7 envolvidos na carcinogênese (Castellsagué X, 2003).

As evidências parecem ser mais consistente para a paridade e tabagismo do que para uso CO. A associação com o uso de CO foi detectada apenas para

adenocarcinoma in situ em um estudo realizado nos EUA (Castellsagué X, 2003), (Lacey JV Jr, 1999) e nos estudos IARC, tanto para carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma (Moreno V, 2002), mas nenhuma associação foi encontrada no estudo de caso-controle do Reino Unido de CIN3 (Deacon JM, 2000) ou no estudo prospectivo de coorte dos EUA (Castellsagué X, 2003), (Castle PE., 2002).

Do ponto de vista da saúde pública, a paridade parece ser um fator comportamental associado a maior proporção de casos CC entre as mulheres infectadas pelo HPV. No entanto, o tabagismo e o uso CO por longo prazo pode ter um impacto semelhante em populações fortemente expostas ao HPV e destes fatores. Os estudos revisados indicam que o tabagismo e a paridade podem ser cofatores que podem modular o risco de uma infecção pelo HPV evoluir para Lesões de alto grau ou Câncer (Castellsagué X, 2003).

O início precoce da atividade sexual, história de múltiplos parceiros e parceiros de alto risco (homens cuja parceira anterior tinha carcinoma de colo uterino, homens com carcinoma de pênis ou homens que tiveram contato com prostitutas), também são fatores de risco conhecidos para o CC (INCA, Programa Nacional de Controle Cancer Colo Utero, 2014).

2.2. Papiloma vírus humano

O Papiloma vírus Humano (HPV) está associado a uma variedade de condições clínicas que variam desde lesões inócuas até aquelas relacionadas ao câncer (Tabela 1). A maioria das infecções são benignos e com curso Limitado (BURD, 2003). O HPV foi reconhecida pela primeira vez como a causa da verrugas cutâneas (verrugas plantares, verrugas comuns, verrugas planas) sobre as mãos e os pés. As verrugas são áreas da pele hipertrofiada preenchido com queratina e são consideradas como sendo principalmente um incômodo cosmético. Geralmente, elas desaparecem espontaneamente dentro de 1-5 anos podendo se manifestar de várias formas. Hiperplasia epitelial focal da cavidade oral (Doença de Heck) é predominantemente causada pelo HPV-13 e tende a regredir espontaneamente (Villiers EM, 1989) (BURD, 2003). Epidermodysplasia Veruciformis uma doença genética rara, com verrugas associadas ao HPV no tronco e membros superiores, pode evoluir para carcinomas de células escamosas invasivo. Papilomas conjuntival e carcinomas associados ao

HPV foram descritos (BURD, 2003) (Villiers EM, 1989). A papilomatose respiratória recorrente é uma doença essencialmente da laringe em crianças com idade média de 3 anos, mas também pode ocorrer em adultos. Porque um alto percentual de mães têm uma história de HPV e os tipos de HPV que causam verrugas ano genitais, são os mesmos que causam a papilomatose sendo pensado ser adquirida a infecção pela passagem por um canal de parto infectado por HPV (BURD, 2003) (Doorslaer KV, 2010). Há também alguma sugestão de que o doença pode ser adquirida no útero desde que os casos foram documentados ao nascer depois da cesárea (Bosch FX, 1995) (Bosch FX., 2013). A ligação entre infecções genitais por HPV e câncer cervical foi demonstrado pela primeira vez no início dos anos 80 por Harold Zur Hausen, virologista alemão ganhador do prêmio Nobel de medicina de 2008 por seus trabalhos com HPV e CC (Zur Hausen H, 1977). Desde então, a ligação entre o HPV e o carcinoma de células escamosas do colo do útero tornou-se bem estabelecida. A magnitude da associação entre HPV e carcinoma de células escamosas do colo do útero é maior do que para a associação entre tabagismo e câncer de pulmão (BURD, 2003) (Franco EL, 1995) (Zur Hausen H., 2002).

Doença associada	Tipos de HPV
Verrugas plantares.	1, 2, 4, 63
Verrugas comuns.	2, 1, 7, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65, 77, 1,
Verrugas planas.	3, 10, 26, 27, 28, 38, 41, 49, 75, 76
Epidermodisplasia verruciformis.	2, 3, 10, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50
Papilomatose respiratória recorrente.	6, 11
Papilomas / carcinomas da conjuntiva.	6, 11, 16
Condiloma acuminado (verrugas genitais),	6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55, 70
Baixo risco para câncer	6, 11, 40, 42, 43, 44, 55
Alto risco para câncer	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66, 68 70.

QUADRO 2 - TIPO DE HPV E DOENÇA ASSOCIADA. ADAPTADO PELO AUTOR. FONTE: (BURD, 2003).

A infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) é uma condição necessária mas não exclusiva para o desenvolvimento de CC (Bosch XF, 2013) (Doorbar J, 2012) (Doorslaer KV, 2010).

Os HPVs são vírus sem envelope, com cerca de 55 nm de diâmetro, com um capsídeo icosaédrico com 72 capsômeros, constituídos de DNA dupla fita, circular,

que contém cerca de 8.000 pares de bases. Anteriormente classificados como pertencentes à família Papovaviridae e subfamília Papillomavirus, nos últimos anos foram reconhecidos como uma família própria: a Papillomaviridae (BURD, 2003) (Villiers EM, Taxonomic Classification of Papillomaviruses., 2001) . O genoma do HPV divide-se em três regiões: região precoce (E), região tardia (L) e região reguladora (URR). A região precoce contém 7 a 8 genes (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 e E8) e a região tardia 2 genes (L1 e L2) (Doorslaer KV, 2010).

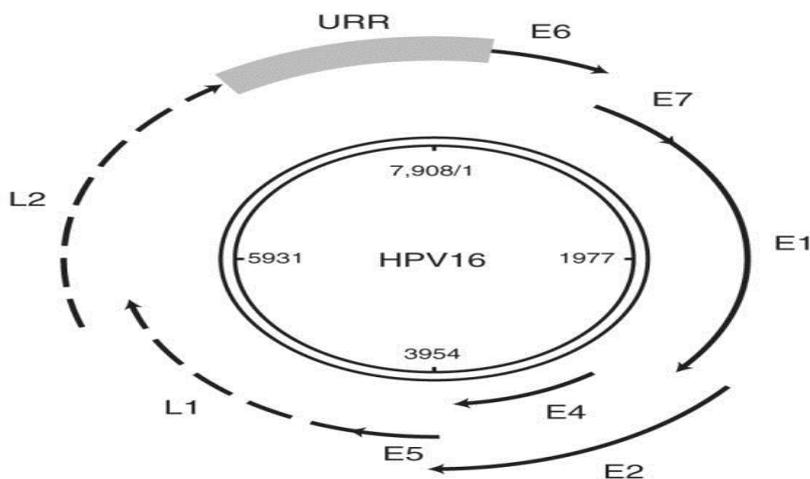


Figura 2- Estrutura esquemática do HPV. adaptado pelo autor .Fonte : (Doorslaer KV, 2010)

A primeira contém o DNA para a replicação viral (E1, E2), regulação da expressão (E2), montagem e liberação do vírus (E4) e imortalização e transformação celular (E5, E6 e E7). E3 e E8 não têm ação conhecida, estando presentes em apenas uma minoria dos HPVs. Os genes L1 e L2 codificam para duas proteínas do capsídeo. A região regulatória que separa estes conjuntos de genes é constituída por 1.000 pb e contém elementos reguladores da expressão e replicação gênicas e do empacotamento de partículas virais (Bosch FX., 2013) .

Os subtipos são definidos quando apresentam entre 2 a 10% de divergência com a sequência nucleotídica de L1, enquanto as variantes apresentam menos de 2% de divergência. Filogeneticamente os tipos que infectam a área genital pertencem ao gênero alfa e os associados com epidermodisplasia verrusiforme cutânea, ao gênero beta. Os diferentes tipos têm tropismo por infectar diferentes tecidos, por exemplo, tipos epidérmicos (HPV 1-4, 10, 26-29, 37, 38, 46, 47, 49, 50, 57), e tipos genitais (HPV 6, 11, 16, 18, vários 30s, 40s, 50s, 60s, 70s). Aproximadamente 40 tipos infectam a área genital. Destes, alguns têm potencial oncogênico, particularmente os

HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 54, 56, 58, 59, 60 e 66 (Doorslaer KV, 2010) (Bosch FX., 2013). Os tipos oncogênicos prevalentes mundialmente são: 16, 18, 45, 31, 33, 58, 52 e 35 (Bosch FX., 2013). Os tipos genitais de HPV podem ser classificados segundo o risco que conferem ao desenvolvimento de lesões neoplásicas do colo uterino em:

Tipos de baixo risco (LR): (HPVs 6, 11, 40, 42, 43 e 44), causadores de verrugas genitais externas (condiloma acuminado) e lesões benignas do colo uterino.

Tipos de alto risco (HR): HPVs tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68 encontrados em lesões de alto grau e carcinoma invasor (Bosch XF, 2013; Bosch FX., 2013) (Bouvard V, 2010) (Smith JS, 2007). Com aumento da evidência epidemiológica identificou-se que a infecção persistente, com oncogênicos α -papiloma vírus humano como causadores de carcinoma cervical (Bosch XF, 2013) (Doorbar J, 2012) (Safaeian M, 2007) (Villa LL, 2005).

2.2.1. História natural e ciclo de vida do HPV

Aproximadamente 45% das mulheres vão adquirir uma infecção nos primeiros 36 meses de atividade sexual (Ho GY, 1998). Em indivíduos saudáveis infecções por HPV regridem espontaneamente em 90 % dos casos dentro de 12-36 meses (Doorslaer KV, 2010) (Woodman CB, 2001) (Ho GY, 1998) . Porém quando ocorre a persistência da infecção (cerca de 10%), associada com os tipos de alto risco do HPV pode acontecer o desenvolvimento de uma lesão pré-invasiva, conhecido como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (Ho GY, 1998) (Rodríguez AC, 2010). Em mulheres de qualquer idade, infecções recentemente detectadas foram associadas com riscos absolutos muito baixos de persistência, NIC 2, ou NIC3+ (Rodríguez AC, 2010) (Castle PE, 2009) (Ho GY, 1998). Para infecções recém-detectados, a taxa de progressão para NIC 2 + (ou NIC 3 +), após 3 anos de acompanhamento, não foi maior para mulheres com idade entre 34 anos e mais velhos do que para as mulheres mais jovens. Além disso, as taxas de novas infecções detectadas diminuiu drasticamente com a idade (Rodríguez AC, 2010) (Goodman MT, 2008). Apesar de que as lesões pré-cancerosas induzidas pelo HPV, em casos raros, podem levar rapidamente ao câncer, o tempo total médio desde a infecção por um HPV cancerígeno até o câncer cervical invasivo, quando isso ocorrer, é de 25-30 anos ou mais (Rodríguez AC, 2010) (McCredie MR, 2008). A classificação histológica tenta prever a capacidade de

progredir para câncer destas lesões pré-invasivas que podem ser divididas como já mencionado em : NIC I com comportamento menos agressivo e com taxa de resolução espontânea mais alta; NIC II com comportamento incerto mas muito mais semelhante ao NIC I e NIC III com possibilidade mais elevado de progressão para câncer (Castle PE, 2009) (Syrjänen, 1996) (Doorslaer KV, 2010). Östör demonstrou que 5% dos NIC2 e mais de 12% dos NIC3 evoluíram para câncer invasor, ao passo que apenas 1% das NIC 1 poderia ter a mesma evolução (Östör, 1993).

TABELA 1- RESUMO DA HISTÓRIA NATURAL DA NIC. ADAPTADO PELO AUTOR. FONTE (Östör, 1993)				
	Regressão	Persistência	Progressão para NIC3	Progressão para Invasão
NIC 1	57%	32%	11%	1%
NIC 2	43%	35%	22%	5%
NIC 3	32%	<56%	-	>12%

O NIC 2 pensava ser um passo intermediário de NIC1 para NIC 3 (precursor direto do CC). Mais recentemente, a existência deste passo intermediário é questionada. Muitos estudos têm demonstrado que a reprodutibilidade da NIC 2 é bastante pobre (McCredie MR, 2008) (Castle PE, 2009), e do comportamento biológico é variável (Castle PE, 2009). Recente dados mostraram que as taxas de regressão da NIC 2 entre as mulheres jovens (Definido como menos de 25 anos) chega até 75% (Bosch XF, 2013) (Castle PE, 2009). NIC 3 é um diagnóstico razoavelmente reprodutível e tem um risco de aproximadamente 30% de desenvolver em câncer invasivo ao longo de anos, se não tratada (Stoler MH, 2001). NIC 3 é, portanto, um ponto de extremidade mais rigoroso para os ensaios clínicos, enquanto NIC 2 representa o limiar para o tratamento de proporcionar uma medida adicional de segurança (NCI, 2014).

Na prática clínica diária nos deparamos com casos de difícil compreensão onde vemos pacientes jovens com doenças agressivas, pacientes que fazem quadros bastante amplos de infecção do HPV com lesões em colo, vagina, vulva e ânus, mas também vemos pacientes que reagem com cura espontânea da lesão (Syrjänen, 1996).

A infecção por HPV, está associada com um risco aumentado do desenvolvimento de câncer cervical em mulheres imunodeficientes, sugerindo que os fatores que afetam o sistema imunológico (tais como predisposição genética)

potencialmente podem influenciar a capacidade do hospedeiro para eliminar uma infecção por HPV (Tsai CC & Eng, 2009). A recorrência de NIC, após o tratamento cirúrgico, em pacientes HIV +, tem sido associada com cargas virais elevadas e baixas contagens de CD4, levando à teoria de que o grau de imunossupressão tem um efeito maior sobre a recorrência da neoplasia (Falter KJ, 2013).

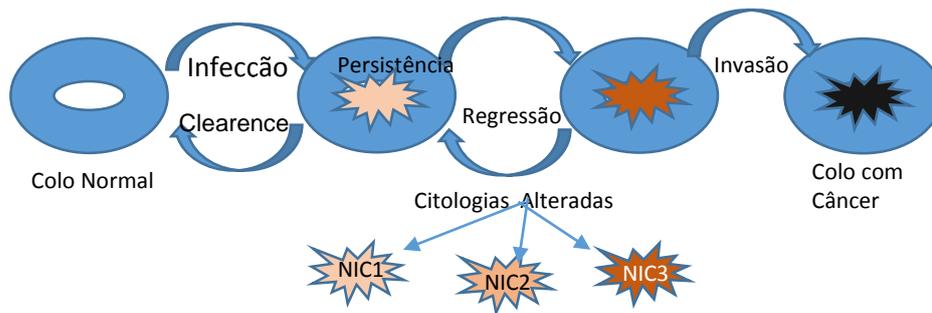


Figura 3 – História evolutiva do Câncer de colo uterino

2.2.2. Oncogênese do HPV

O genoma do HPV divide-se em três regiões: região precoce (E), região tardia (L) e região reguladora (URR). A região precoce contém 7 a 8 genes (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 e E8) e a região tardia 2 genes (L1 e L2). A primeira contém o DNA para a replicação viral (E1, E2), regulação da expressão (E2), montagem e liberação do vírus (E4) e immortalização e transformação celular (E5, E6 e E7). E3 e E8 não têm ação conhecida, estando presentes em apenas uma minoria dos HPVs. Os genes L1 e L2 codificam para duas proteínas do capsídeo (Deligeoroglou E, 2013). As oncoproteínas E6 e E7 contribuem para a iniciação do tumor e também desempenham um papel importante na progressão maligna através da indução da instabilidade genômica e outros mecanismos. Sendo isto necessário para a indução e a manutenção da expressão do fenótipo transformado de HPV E6 e E7 (McLaughlin-Drubin ME, 2008).

Genes iniciais são expressos nas camadas basal, supra basal, e as células intermediárias do colo do útero, ao passo que os genes de manifestação tardia, responsáveis pelas proteínas da cápside, são ativados nas camadas apicais. E1 prepara o genoma viral a ser replicado na célula hospedeira. E2 mantém a forma episossomal do genoma viral e organiza a sua transcrição. E4 não tem sua ação potencial esclarecida. Até agora, a sua expressão é aparente ao longo do epitélio. E4

facilita a replicação viral e interrompe o citoesqueleto, a fim de facilitar a evacuação dos vírus para fora das células diferenciadas. A proteína E5, quando presente, modifica a função dos receptores do fator de crescimento (Zhang B, 2002).

As proteínas E6 e E7 são as principais ferramentas oncogênicas no genoma viral. Em HPV baixo risco E6 e E7 aparecem inativas ou fracamente ativas. Pelo contrário, os oncogenes nos vírus do tipo de alto risco são transcritos enquanto vírus de HPV de alto risco integra o seu DNA no DNA celular (Bosch XF, 2013) (Zur Hausen H., 2002) (Münger K, 2002). A proteína E6 se liga principalmente a proteína p53 supressora de tumor e prende a célula na fase S do ciclo celular, o que dificulta a apoptose e aumentando a capacidade de transformação. E7 se liga e inativa pra supressor de tumor, resultando em tumorigênese (Münger K, 2002) (Faridi R, 2011) (Deligeoroglou E, 2013) (Bosch XF, 2013).

Os principais alvos celulares das oncoproteínas E6 e E7 do HPV, são o p53 e os caminhos supressores de tumor pRb, estes pontos são disfuncionais em algum nível em quase todos os tumores sólidos humanos estas aberrações são bem aceitas para representar "mutações do controlador" quase universais (McLaughlin-Drubin ME, 2008). A oncoproteína E7 atua através da ligação de seu produto proteico com proteínas da família supressora tumoral pRb, que, pela interação com a família E2F dos fatores transcricionais, controla a replicação celular (Boyer, 1996). Essa interação induz múltiplas respostas celulares, incluindo mecanismos que estabilizam p53, a qual, não controla a proliferação celular (Prendiville & Davies, 2004.) O gene do retinoblastoma (RB1) é um importante gene supressor tumoral que está deletado ou mutado em muitas linhagens celulares tumorais. O produto do gene RB1, a proteína pRb e os membros de sua família, p107 e p130 são alvos da oncoproteína HPV E7 (Klingelutz & J.K., 1996) (Cordeiro J.C., 2013).

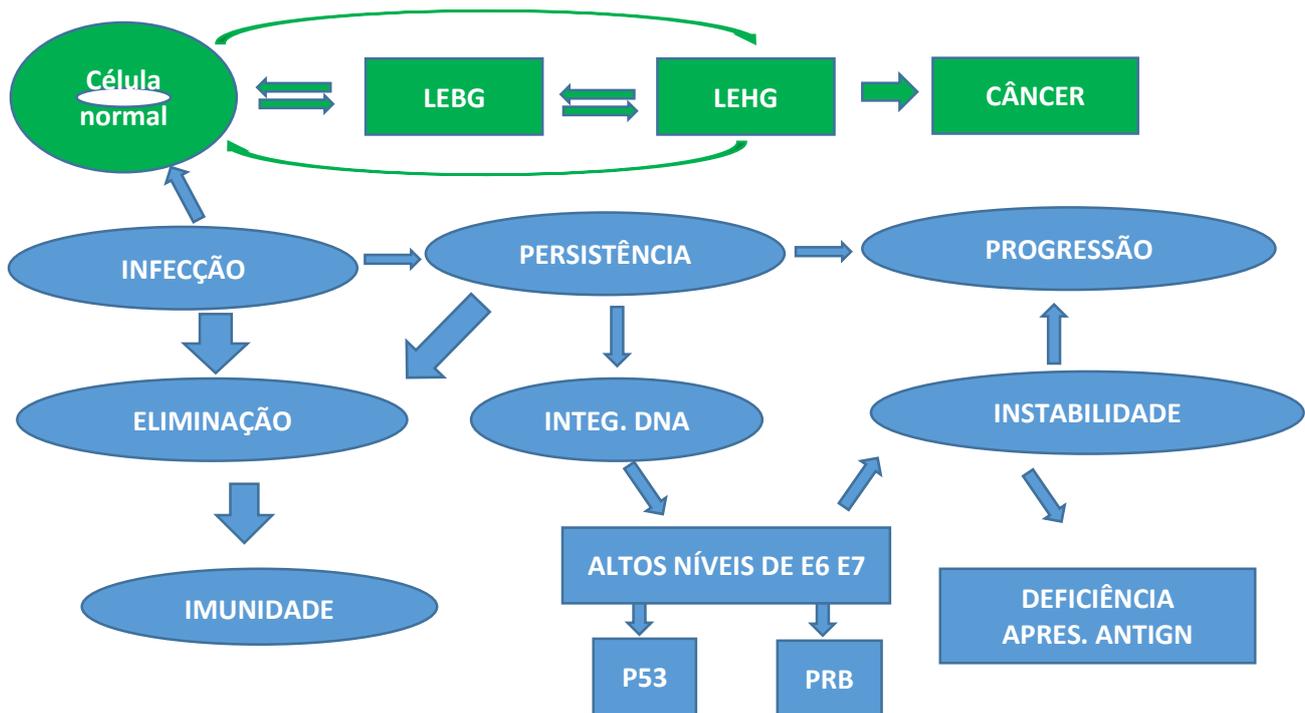


Figura 4 – Mecanismo da carcinogênese por HPV, adaptado pelo autor
 FONTE: (Prendiville & Davies, 2004.) (Cordeiro J.C., 2013).

NOTA: HSIL: lesões intraepiteliais escamosas de alto risco (NIC II e NIC III); LSIL: lesões intraepiteliais escamosas de baixo risco (NIC I).

2.2.3. Resposta imune do hospedeiro contra o HPV

Infecção por HPV no trato genital é comum em indivíduos jovens sexualmente ativos, a maioria dos quais consegue eliminar a infecção sem apresentar clínica evidente. Entretanto, a maioria das pessoas que desenvolvem lesões benignas, conseguem com base em uma resposta imune mediada célula (CMI) fazer com que as lesões regredam. A incapacidade de desenvolver eficaz CMI para limpar ou controlar infecção, resulta em infecção persistente e, no caso dos HPV oncogênicos, maior probabilidade de progressão para NIC 3 e carcinoma. A duração prolongada de infecção associados com HPV parece estar associado com a evasão eficaz de imunidade inata, atrasando assim a ativação da imunidade adaptativa (Stanley M, 2010).

Para iniciar seu ciclo de vida, um vírus deve se ligar a célula hospedeira e atravessar a membrana plasmática para ganhar acesso ao interior célula para a sobrevivência e replicação (García-Pineros AJ, 2006) (Kilpatrick, 2002). Como as células epiteliais não são boas apresentadoras de antígenos, o HPV passa despercebido pelo sistema imunológico e permanece no interior das células epiteliais sem causar maiores danos.

O HPV possui um ciclo de replicação dependente exclusivamente da diferenciação epitelial, nos quais os genes são expressos diferentemente. Na camada basal são expressos os genes precoces com baixo número de cópias virais, à medida que progride a maturação celular são expressos os genes precoces com grande quantidade de cópias virais e nas camadas superficiais da pele se expressam os genes tardios L1 e L2 que formam os vírions infectante (Doorbar J, 2012) (Bosch XF, 2013) . A ligação do vírus é mediada pela ligação de uma proteína que está presente na superfície do vírus, a uma molécula na superfície da célula que funciona como um receptor que inadvertidamente é aproveitado pelo vírus. (García-Pineros AJ, 2006). As células infectadas pelo HPV são capazes de sensibilizar as células NK ativadas pelas citocinas, e macrófagos ativados conseguem eliminar estas células infectadas, podendo assim controlar o desenvolvimento do câncer cervical (Bosch XF, 2013).

O sistema imunológico é uma rede funcional complexa de diversas células e moléculas a coordenar a imunidade inata e adaptativa. A informação biológica, para executar estas interações complexas, não só é armazenado em sequências de proteínas, mas também na estrutura da parte glicano de glicoconjugados (Buzás EI, 2006).

O sistema imune inato, que fornece proteção inespecífica contra uma variedade de agentes patogênicos, representa a primeira linha de defesa contra o HPV e consequentemente desempenha um papel importante no controle da infecção (Kadish AS, 2002). A resposta imune inata envolve ligação de moléculas do hospedeiro à superfície ligada à membrana organismos patogênicos, incluindo vírus, bactérias, parasitas, e fungos. Estas interações podem levar à sinalização para posteriores respostas imunes ou neutralização da infectividade do agente patogênico (Dam & Brewer, 2010) (García-Pineros AJ, 2006) (Vasta, 2009).

2.2.4. Mecanismos de fuga do vírus HPV do sistema imunológico

O HPV foge efetivamente do reconhecimento pelo sistema imune por muitos meses. O ciclo infeccioso em si é um mecanismo para isso devido: 1) Não há nenhuma viremia, níveis muito baixos de proteína virais são encontrados na circulação. 2) O HPV não é citolítico. 3) A replicação do vírus e a montagem ocorre em células já

destinadas a morrer por “anoikis” ou seja morte por causas naturais, 4) Não há nenhum sinal de inflamação e perigo para alertar o sistema imunológico. 5) A resposta mediada por interferon para a infecção pelo HPV, que é um mecanismo chave de defesa antiviral (Pett MR, 2006), está ativamente reprimidas pelas proteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco (Kanodia S, 2007). As proteínas E7 diminuem a eficácia dos TLR9 (Hasan UA, 2007), TLRs pertencem a uma família de receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos e são expressos em células imunes e não imunes, dotando-as com a capacidade de sentir os produtos derivados de organismos patogênicos e para alertar o sistema imunológico (Kaisho, 2003) (Hasan UA, 2007). Com isso tudo o HPV efetivamente escapa da resposta imune inata atrasando a ativação da imunidade adaptativa. (Stanley M, 2010).

2.2.5 Vacinação e a resposta vacinal contra HPV

Mecanismos imunológicos de proteção contra a infecção e para eliminação da infecção não são necessariamente os mesmos; esta última é quase invariavelmente o resultado de imunidade mediada por células recrutamento e ativação de células efetoras citotóxicas. Esta mesma se apresenta irrelevante para a prevenção da infecção pelo HPV e doença por ele induzida. (Carter JJ, 2000) (Stanley M, 2010)

Porém a vacina profilática, tem apresentado sucesso através de anticorpos. A Soro conversão na infecção natural resulta na produção de anticorpos neutralizantes contra a proteína L1 do capsídio viral, mas isso se faz de forma lenta (8 a 9 meses) com uma concentração baixa e apenas 50 a 70% das mulheres expostas ao vírus soro-convertem. (Carter JJ, 2000) (Stanley M, 2010) (Bosch FX., 2013)

2.2.6 Mecanismos de proteção induzida pela vacina

A hipótese atual é de que partículas semelhantes ao vírus HPV (VLP) produzam anticorpos. A imunização sistêmica com VLPs de L1 gera concentrações de anticorpos 1-4 vezes maior que de uma forma natural Infecção, (Harper DM, 2004). As VLPs encontram-se rapidamente as células dendríticas estromais, em meio

inflamatório induzido por vacinação intramuscular, são fortemente ativados para migrar aos tecidos linfáticos onde os linfócitos T auxiliares iniciam a cascata de reconhecimento e memória imunológica. Ao mesmo tempo, VLPs ligados a superfície de APC (células apresentadoras de antígenos) ou outros imunócitos locais são transportados para o linfonodo encontrando células B naíve no folículo que também resultará em imunidade. Na verdade a VLP é intrinsecamente muito imunogênica por isso pode ativar os sensores imunes inatas, mesmo na ausência de adjuvante (Harro CD, 2001) (Stanley M, 2010).

Com o início da vacinação contra o HPV que está principalmente focado nos HPVs oncogênicos tipos 16 e 18, que estão entre os mais prevalentes, vimos que este grupo de pacientes vacinados tiveram muito menos doença que os controles (Bosch XF, 2013) (Villa LL, 2005).

Considerando esta resposta vacinal, poderíamos acreditar que a resposta do organismo a infecção do HPV está muito mais dependente do sistema imunológico do hospedeiro do que das capacidades de agressão do vírus.

2.2.7 - Imunidade inata e adaptativa

A função imunológica é conceitualmente dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata é a resposta rápida e automática a um número grande, mas limitado, de estímulos. É representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores, e não se altera qualitativa ou quantitativamente após o contato (Medzhitov R, 2000) (Cruvinel WM, 2010).

As principais células efetoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células Natural Killer – NK (Figura 5). Fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, bem como síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas são os principais mecanismos na imunidade inata. Esses mecanismos são ativados por estímulos específicos, representados por estruturas moleculares de ocorrência ubíqua em micro-organismos, códigos de identificação comumente encontrados em microrganismos, mas que não ocorrem na espécie humana. Moléculas tais como

lipopolissacarídeos, resíduos de manose e ácidos teicoicos, encontradas na superfície de micro-organismos, constituem Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e ativam a resposta imune inata, por interação com diferentes receptores conhecidos como Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRP), dentre os quais a família dos receptores Toll-like (TLRs) (Medzhitov R., 1997) (Cruvinel WM, 2010). Essa interação é semelhante à complementaridade entre antígeno e anticorpo ou entre antígeno e receptor de linfócitos T (TCR), mas, nesse caso, não há diversidade nem capacidade adaptativa para a geração de novos receptores ou reconhecimento de novos padrões moleculares que não aqueles já programados no código genético.

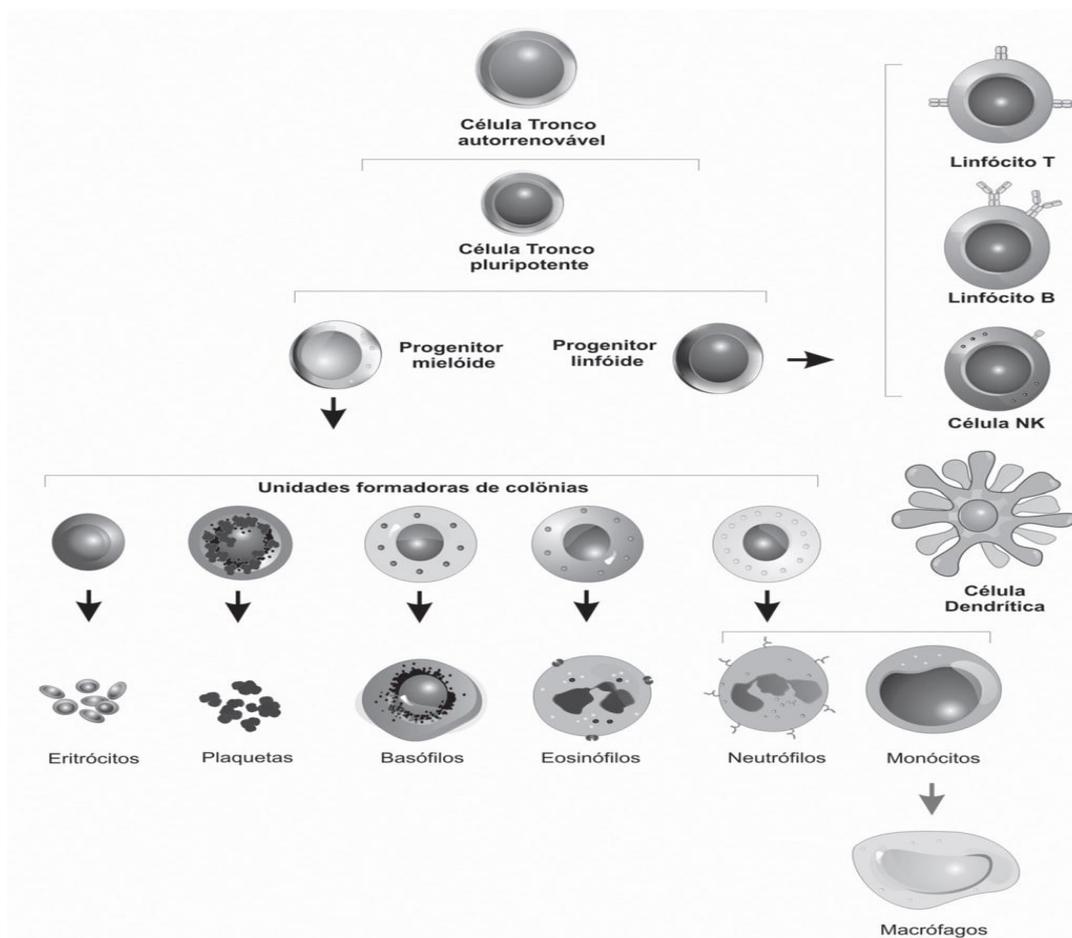


Figura 5- Origem das diversas linhagens de células do Sistema Imunológico

Entre os vários RRP's envolvidos em opsonização, ativação de complemento e fagocitose, os TLRs se destacam por seu papel central na ligação a patógenos e iniciação da resposta inflamatória. Esses receptores estão presentes principalmente em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (DCs).

Atualmente, 11 diferentes TLRs já foram identificados, alguns localizados na membrana celular, outros no interior das células (Figura 6) (Janeway CA, 2002)

(Cruvinel WM, 2010) (Abbas AK, 2003). Outros receptores presentes em fagócitos, com importante papel na resposta imune, são aqueles para frações do complemento, citocinas, interleucinas e imunoglobulinas (Abbas AK, 2003) (Cruvinel WM, 2010) .

Em contraposição à resposta inata, a resposta imune adaptativa depende da ativação de células especializadas, os linfócitos, e das moléculas solúveis por eles produzidas (Quadro 2). As principais características da resposta adquirida são: especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo. Embora as principais células envolvidas na resposta imune adquirida sejam os linfócitos, as células apresentadoras de antígenos (APCs) desempenham papel fundamental em sua ativação, apresentando antígenos associados a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC, major histocompatibility complex) para os linfócitos T (LT). (Cruvinel WM, 2010) (Delves PJ, 2000) .A Figura 5 ilustra as diversas células que compõem o sistema imunológico .

Componente	Imunidade inata	Imunidade adquirida
Células	Fagócitos (células dendríticas, macrófagos e neutrófilos) Células <i>naturalkiller</i> (NK) Mastócitos, basófilos e eosinófilos	Linfócitos T, B e NK/T Células dendríticas ou apresentadoras de antígenos (APCs)
Moléculas solúveis	Complemento Proteínas de fase aguda Citocinas, Quimiocinas MBL, MASP e Ficolinas	Anticorpos Citocinas, Quimiocinas

QUADRO 2-CÉLULAS E MOLÉCULAS SOLÚVEIS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO
ADAPTADO : (Cruvinel WM, 2010)

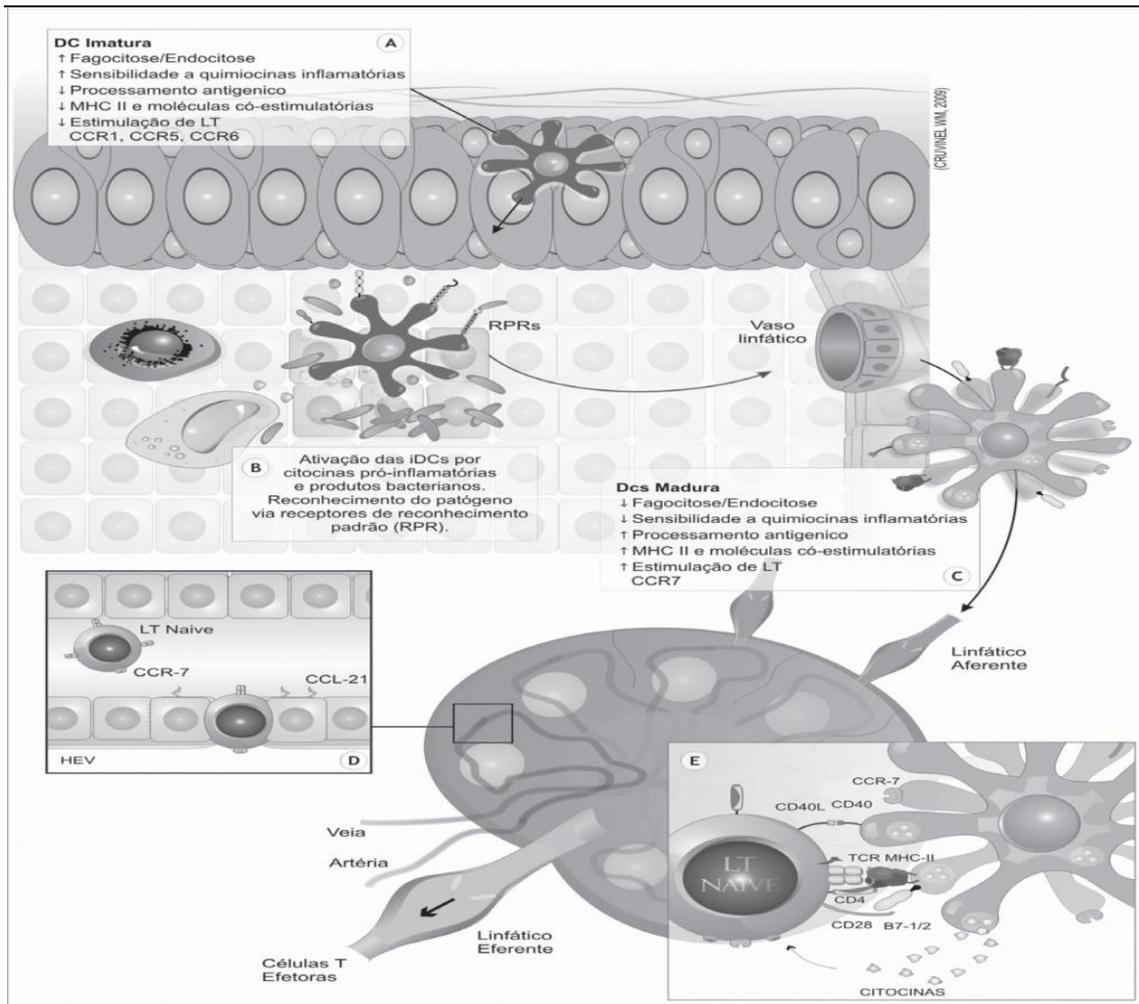


Figura 6- Resposta do sistema imune inato

Células dendríticas e geração de LTs antígenos específicos.

(A) Características das Células Dendríticas Imaturas (iDCs).

(B) Ativação e captação de patógenos por intermédio das citocinas do microambiente e da interação com os Receptores de Reconhecimento Padrão, com consequente migração das DCs para os linfonodos.

(C) Maturação das Células Dendríticas. (D) Migração das células T Naive para a região paracortical do linfonodo. Entrada através das vênulas endoteliais altas (HEV) e migração orientada por quimiocinas do tecido linfoide.

(E) Apresentação dos Ags processados aos linfócitos T, gerando

células efetoras ativadas. Adaptado : (Cruvinel WM, 2010)

2.3 Sistema complemento

O sistema do complemento é um parte integrante do sistema imunológico inato formado por mais de 40 proteínas, sintetizadas no fígado, e liberadas no sangue para interagir com os leucócitos (Iturry-Yamamoto GR, 2001) (Alexander JJ, 2008). São basicamente como enzimas inativas e sua ativação desencadeia uma cascata proteolítica, desencadeando uma série de reações imunológicas de funções efetoras,

incluindo o aumento da fagocitose, o recrutamento de células inflamatórias, a formação de poros em membranas e promovendo um papel instrutivo sobre a resposta imune adaptativa (Iturry-Yamamoto GR, 2001) . O Complemento pode ser ativado através das vias alternativa, clássica, e a via das lectinas (Ricklin D., 2010) (Kjaera Tr, 2013). A composição dos dois primeiros caminhos foi estabelecida há muito tempo, ao passo que para a via da lectina de novos membros foram adicionados durante os últimos anos (Thiel S., 2012) (Degn SE, 2009).

2.3.1. Via clássica

A via clássica do sistema complemento, foi assim denominada por ser a primeira a ser descrita. Formam parte dela os componentes C1, C4, C2 e C3 ativados em cascata (Iturry-Yamamoto GR, 2001) . Caracteriza-se por se utilizar de anticorpos (imunoglobulinas) previamente adquiridos, pois eles são necessários para que a proteína C1 inicie a cascata de eventos para a opsonização dos antígenos pelos fagócitos (macrófagos e neutrófilos) da resposta imune Inata (Frank MM, 1989). A Proteína Complemento nº 1, ou C1 é um complexo molecular multimérico com p.m. de 900 kD, composto de uma subunidade C1q, associada a duas moléculas C1r e duas moléculas C1s por ligações dependentes de cálcio (Ziccardi RJ, 1983). C1q é a subunidade que se liga à molécula de imunoglobulina. E ela se torna uma proteína ativada, ou seja, a simples conexão de um único domínio da C1 com o anticorpo ativa toda a proteína. E aí então ela ativa a C4, que se conecta à ela (Iturry-Yamamoto GR, 2001) (Ziccardi RJ, 1983) (Lim HW, 1990).

A proteína C4 é uma Beta globulina composta por três cadeias polipeptídicas denominadas alfa, beta e gama, com p.m. de 210 kD. A molécula de C4 contém uma ligação tioéster na cadeia alfa. A clivagem de C4 por C1s forma C4a e C4b. Como resultado desta clivagem, a ligação tioéster da cadeia alfa converte-se em uma ligação instável, suscetível ao ataque de grupos nucleofílicos (Lim HW, 1990), C4a e C4b, quando estão juntos, tornam a proteína inativa. Isso ocorre com todas as proteínas do sistema complemento. Logo após a conexão entre a C1 e a C4b, o domínio C4a é separado do complexo. O domínio C4b conectado à C1 atrai a C2 que consiste de uma cadeia polipeptídica com p.m. de 110 kD. A clivagem desta molécula forma C2a e C2b (Lim HW, 1990), o domínio C2a se liga ao complexo (Noris M, 2013). Após formação do complexo C4bC2a, a proteína C3 é ativada a também se conectar nesse

complexo. Logo, quer dizer que a C3b somente se liga no complexo C4bC2a quando a C3a é retirada e volta para a corrente sanguínea. Essa clivagem (separação/hidrólise/quebra em 2) da C3 só ocorre porque o complexo C4bC2a ativado forma uma enzima chamada C3Convertase, que cliva a C3 em C3a e C3b (Noris M, 2013) (RiedemannNC, 2003) (Iturry-Yamamoto GR, 2001). (Ricklin D., 2010).

A ligação tioéster das moléculas de C3b sofre hidrólise, depositando-se sobre aceptores da superfície celular das partículas ditas ativadoras da via alternativa, como células infectadas por vírus, células tumorais, bactérias gram-negativas, fungos, protozoários (Silva WD, 1984).

Moléculas de C3b formadas através da via clássica podem servir de substrato para a ativação da via alternativa. Este mecanismo é chamado de alça de amplificação (Law SKA, 1988).

Quando as C4b, C2b e C3b se juntam, formam um complexo chamado C5 convertase que atrai a C5, que é uma Beta globulina com p.m. de 190 kD, similar a C3 e C4, mas não contendo a ligação tioéster. A clivagem de C5 pela C5-convertase, tanto da via clássica como alternativa, forma C5a e C5b. C3a e principalmente C5a são potentes anafilatoxinas, além de ser o C5, o mais importante fator quimiotático derivado do SC (Silva WD, 1984) (Ward PA, 2012). Uma vez o Complexo lógico C4bC2bC3b ativado, uma conexão no C5b se abre para que, as proteínas C6, C7, C8 e C9 se "liguem" à ele. Essas novas proteínas são cadeias peptídicas que se conectam formando um anel, este anel recebe chamado de "Membrane Attack Complement" MAC, ou CLM (Complexo Lítico de Membrana) que abre buracos na membrana da bactéria (Alexander JJ, 2008) (Yamamoto K, 1983) (Biesecker G, 1983) (Hansch GM, 1988). O CLM insere-se na membrana alvo, das células gram negativas (Ward PA, 2012), levando a alterações na estrutura e função desta, ocorrendo a saída de material citoplasmático de baixo peso molecular, a entrada de líquido e sais, levando ao intumescimento celular e conseqüente rompimento das membranas por lise osmótica (Hansch GM, 1988).

A opsonização ocorre com a ligação no C3br, que é um receptor nos macrófagos que se ligará ao complexo C1C4bC2bC3b estimulando a fagocitose da bactéria (Ricklin D., 2010).

2.3.2. Via alternativa

A ativação da via alternativa depende dos seguintes fatores: fator D, fator B, properdina e C3. O fator B (pré-ativador de C3) é uma Beta globulina termo lábil, com p.m. de 93 kD, que consiste de uma única cadeia polipeptídica (Rother K, 1988). O fator D é uma Alfa globulina termo lábil, de p.m. de 25 kD, que consiste de uma cadeia polipeptídica única (Rother K, 1988), uma enzima que existe no organismo na forma ativada (Williams LW, 1988), e que cliva o fator B, formando Bb. A properdina, uma gamaglobulina tetramérica com p.m. de 220 kD (MA., 1980), é uma das proteínas reguladoras da via alternativa do complemento, sendo sua principal função estabilizar a convertase de C3 e C5 (Law SKA, 1988) (Iturry-Yamamoto GR, 2001).

Quando não há imunoglobulinas então o sistema complemento pode ser ativada por lipopolissacarídeos presentes em membranas de várias bactérias, proteínas da superfície de alguns vírus e de parasitas, enzimas tipo tripsina, alguns imunocomplexos e o fator de veneno de cobra, determinados fungos, e helmintos com determinadas características, especialmente a ausência de ácido siálico na membrana, (Frank MM, 1989) . Durante uma resposta inflamatória, estes fatores atraem as proteínas do sistema complemento que saem dos vasos sanguíneos ocasionada pela liberação de histamina, leucotrienos e prostaglandinas pelos mastócitos, que deixam esses vasos espessos e permeáveis. Quando isso acontece, a proteína C3 se conecta à esses antígenos da membrana das bactérias, e é imediatamente clivado, perdendo o domínio C3a, então, assim como na via clássica, só o C3b fica preso à bactéria (Williams LW, 1988). Quando essa C3b se conecta, ela atrai a proteína B, ou "Fator B", que também possui um domínio "a" e "b". O domínio Ba é retirado e fica somente o Bb, formando o complexo C3bBb, ou complexo C3bBb Convertase. Esse complexo atrai mais um C3b, formando a C5 convertase. Isso quer dizer que para formar uma C5 convertase não é necessário ter C1, C4b C2b no complexo como ocorre na via clássica, mas APENAS fazer com que as proteínas C5b, C6, C7, C8 e C9 sejam atraídas para a ação e formem MAC. Isso é que o Evento Terminal Comum, pois é a mesma para as duas vias do sistemas complemento. (Williams LW, 1988) (Silva WD, 1984) (Iturry-Yamamoto GR, 2001).

2.3.3. Via das lectinas

Os principais efetores da via das lectinas são as moléculas de reconhecimento: As colectinas, lectina de ligação a manose (MBL), colectina K - 1 (CL - K1), e as três ficolinas (H – ficolina, L - ficolina e M - ficolina). Associado com estes estão três Proteases da Serina associadas a MBL, (MASP) MASP - 1, MASP - 2 e MASP - 3 e duas proteínas associadas a MBL a MAp19 (também conhecido como SMAP) e MAp44 (também chamado MAP - 1) (Kjaera Tr, 2013). Na via da lectina, a MBL e ficolinas agem como moléculas de reconhecimento, e serina proteases associada a MBL (MASP) é uma enzima-chave; A MASP- 2 é responsável pela ativação da via da lectina. A função de outras serina-proteases (MASP - 1 e MASP - 3) é ainda obscura. (Takahashi M I. Y., 2010). Estudos sugerem que MASP-1 desempenha um papel fundamental na ativação da via das lectinas, provavelmente através da ativação de MASP-2. (Takahashi M D. I., 2008).

A via das Lectinas (VL) atua como reconhecedora de padrões de hidratos de carbono. As serina proteases associados a MBL (MASP), que compartilham uma semelhança estrutural com C1r/C1s se ligam a Manose na parede microbiana. O resultado final é a clivagem de C4 e C2 para formar C4b2a, a C3 convertase que irá gerar C3a e C3b (Ward PA, 2012).

Destes, apenas a MASP-2 cliva tanto C4 e C2, que geram a mesma C3 convertase da VC. Em contraste, MASP-1 cliva C2 mas não C4 e pode completar a resposta VL uma vez iniciado, não aumentando a eficiência de formação de convertase. (Ricklin D., 2010) (Dobo J, 2009)

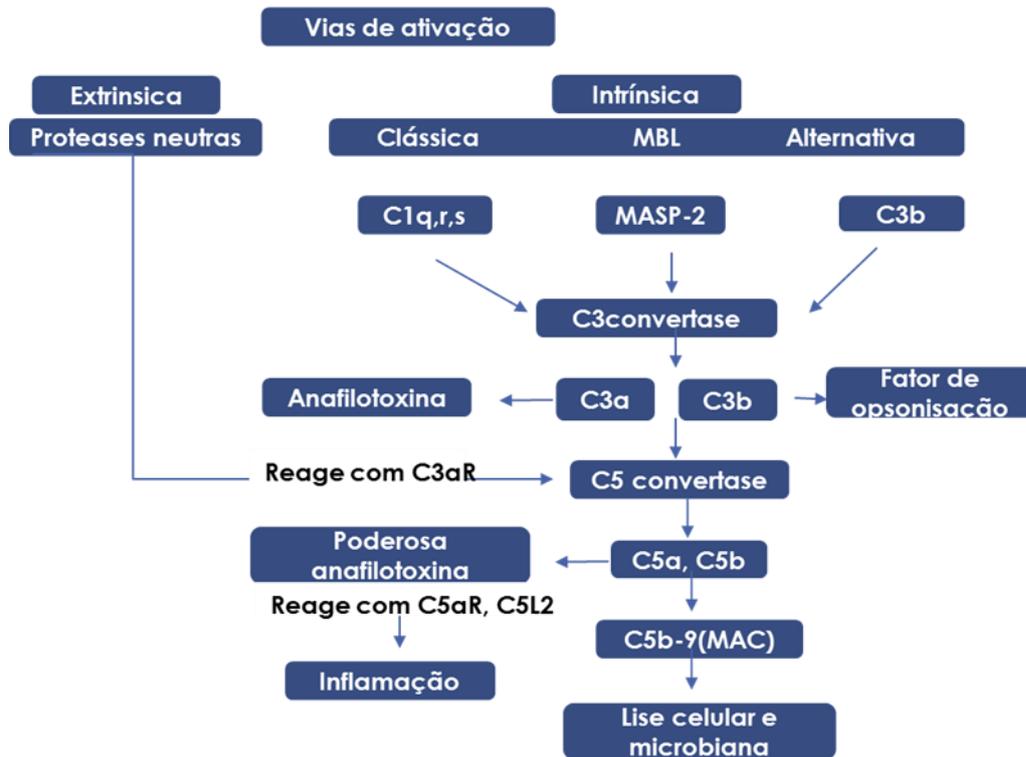


Figura 7- Esquema resumido da ativação do sistema complemento (Ward PA, 2012).
adaptado pelo autor

Assim, muitas células e moléculas estão tomando parte nestes sistemas de defesa antimicrobianas e, ao mesmo tempo estão envolvidos na remoção de células apoptóticas ou necróticas e os componentes do tecido (Nauta AJ, 2003) (Kjaera Tr, 2013).

Estudos demonstram que as partículas semelhantes a vírus papiloma humano (HPV-VLP) se ligam a células dendríticas e são capazes de induzir uma variedade de respostas em células do sistema imune, em particular a produção de citocinas e a proteína quimiotática de monócitos 2 (PQM-2). (Akruddin J.M., 2007) (García-Pineros AJ, 2006). Isto também é facilmente percebido nos grupos com baixa imunidade (pacientes transplantadas, reumatologias, hiv+) onde temos mais incidência de doença HPV. A menor taxa de depuração de lesões associadas ao HPV em imunodeficientes em comparação com pacientes imunocompetentes indica que as respostas imunes mediadas por células são importantes para o controle de doença associada ao HPV (Palefski, 1995) (Roden & Wu, 2006). A resposta imune primária a uma infecção por HPV é mediada por células; portanto, as condições que comprometem a imunidade celular, tais como o transplante renal ou imunodeficiência humana adquirida(SIDA), aumentam o risco de aquisição e progressão de HPV. (BURD, 2003) (Kadish AS, 2002). Pacientes transplantados que tomam drogas imunossupressoras e pacientes infectados pelo HIV têm uma doença mais grave e

recidivante, com carga viral elevada, infecções com genótipos incomuns de HPV e maior propensão para doenças malignas relacionadas com o HPV, especialmente câncer cervical (um risco aumentado oito vezes em mulheres infectadas pelo HIV) e câncer anal (um risco aumentado 42 vezes em homens infectados pelo HIV) (Roden & Wu, 2006) (Clifford GM, 2005) (Palefsky JM., 2009).

Östor concluiu em sua revisão que a morfologia por si só, não prediz qual lesão vai progredir ou regredir, devemos procurar outros indicadores, além dos fatores morfológicos para determinar o prognóstico individualmente nos pacientes (Östor, 1993). Rodriguez vai além e propõe a busca de biomarcadores que influenciem na persistência da infecção de HPV (Rodriguez AC, 2010).

2.4. MBL

A lectina de ligação a manose (MBL) é uma glicoproteína de plasma que é sintetizada principalmente no fígado (Turner MW, 2003). A MBL é capaz de se ligar hidratos de carbono (tais como manose e N - acetilglucosamina) presente na superfície de microrganismos (incluindo bactérias, vírus e fungos) e ativar o sistema complemento , mas também pode promover opsonofagocitose , modular a inflamação, e colaborar na apoptose (Frederiksen PD, 2006) (Takahashi M., 2008) (Ytting H. C. I., 2007) (Turner MW, 2003). A ativação da via é desencadeada por serina-proteases (MASP) associados com a MBL ou com as ficolinas. Algumas evidências in vitro sugerem que a MASP - 2 por si só é suficiente para desencadear a ativação do complemento. No entanto, o papel de MASP - 1 na via da lectina é ainda controversa. (Takahashi M., 2008).

MBL humana é codificada por um gene designado MBL-2, que está localizado no cromossoma 10q11.2-q21.12. Existem cinco polimorfismos conhecidos dentro da MBL-2 que pode afetar os valores de MBL no plasma. Estas mutações afetam a transcrição do complexo basal-promotor, o que reduz os níveis de circulação de MBL. Estudos anteriores também têm demonstrado que os indivíduos com alelos variantes estão em um risco maior para infecção viral. No entanto, os resultados de outros estudos não suportam o que níveis de MBL, são um fator de risco para infecção viral. (Tsai CC & Eng, 2009)

Vários trabalhos têm relacionado a deficiência de MBL a diversas condições clínicas, tais como infecções recorrentes graves em pacientes com câncer tratados

com quimioterapia, bem como em outros pacientes imunocomprometidos. Estudos epidemiológicos sugerem que a variação geneticamente determinada em níveis de MBL influencia a susceptibilidade e o curso de diferentes tipos de doenças infecciosas, autoimunes, doenças cardiovasculares e metabólicas (Turner MW, 2003) (Zhang N, 2013)

Alguns parâmetros, como horário da coleta do sangue, a idade, o sexo e o exercício físico não influenciam os perfis circulatórios de MBL e estas características devem ser consideradas no para potencial uso dessas moléculas como biomarcadores clínicos (Ytting H. C. I., 2007) (Ip WK, 2004). Os níveis séricos e plasmáticos são apenas marginalmente diferente, e foram independentes da idade e sexo. Os níveis circulantes de MBL são estáveis ao longo do tempo em indivíduos saudáveis, o que é vantajoso para a sua aplicação potencial como biomarcadores (Ytting H. C. I., 2007). Um elevado nível de MBL em geral tem sido observada para alguns grupos de pacientes, quando comparada com a de controles saudáveis e foi descrito para os pacientes com doenças tão diversas como a asma, doença reumática do coração, diabetes do tipo I, cirrose do fígado e do câncer colorretal (Ytting H. C. I., 2007).

Polimorfismos do gene MBL2 podem diminuir os níveis séricos de MBL. Esta diminuição da concentração MBL é conhecida por estar relacionada com a vulnerabilidade a infecções, por uma vasta gama de microrganismos, incluindo vírus (Ludovica Segat, 2009) (Tsai CC & Eng, 2009) (Kilpatrick, 2002). Existem diferentes polimorfismos conhecidos dentro gene MBL2 que afetam as concentrações de MBL. O sistema imunológico é redundante ou seja, várias vias independentes promovem a defesa e homeostase do organismo, porém determinadas falhas podem agir como facilitadoras de infecção. (Turner MW, 2003) (Buzás EI, 2006) (Dam & Brewer, 2010).

2.4.1. Evidências da Interação da MBL e HPV

Alguns estudos que avaliaram o polimorfismo do gene MBL2 sugerem uma relação com a infecção de HPV, Segat cita ter demonstrado uma associação de polimorfismos MBL2 com infecção por HPV de alto risco em mulheres sem CC, ao passo que não houve correlação entre as mulheres que desenvolveram câncer, sugerindo a hipótese de um possível papel para polimorfismos MBL2, responsável para a produção defeituosa de proteína MBL, e no aumento susceptibilidade à

infecção por HPV de alto risco, mas não para o câncer do colo do útero . (Segat I, 2009). Também observado de forma semelhante por Guimarães que o polimorfismos podem interferir com qualquer tipo de HPV de alto, e de baixo risco durante a primeira fase da infecção (Guimaraes V., 2008) . Nevadunsky mostrou a diminuição da concentração de MBL no fluido vaginal estudada em vários casos de câncer ginecológico, porém só encontrado um valor significativo com câncer ovariano, outros tumores como endométrio ou colo uterino não houve significância (Nevadunsky NS, 2012).

3 Justificativa

Conforme já citado, Östor sugere em sua revisão de 1993 que a morfologia por si só, não prediz qual lesão vai progredir ou regredir, e devemos procurar outros indicadores, além dos fatores morfológicos, para determinar o prognóstico individual dos pacientes (Östor, 1993).

Paralelo a isto outros pesquisadores como Rodriguez propõe a busca de biomarcadores que influenciem na persistência da infecção de HPV (Rodriguez AC, 2010). A identificação de biomarcadores que possam identificar pessoas mais vulneráveis a uma má evolução da infecção do HPV, poderão não só oferecer uma proteção adicional a este grupo como facilitar políticas e estratégias de combate as doenças relacionadas a este vírus.

4 Objetivos

Neste estudo transversal o objetivo principal foi de dosarmos as concentrações de MBL em mulheres divididas em 4 grupos, pacientes com NIC1, NIC2, NIC3, e câncer de colo uterino, verificando se há algum tipo de relação entre as concentrações plasmáticas de MBL e a evolução das neoplasias epiteliais cervicais.

Como objetivos secundários avaliaremos as distribuições das concentrações entre as diferentes faixas etárias.

5 Método

5.1 Caracterização da amostra

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Erasto Gaertner (HEG) envolvendo, um total 364 pacientes, atendidas no serviço de ginecologia do (HEG), um centro de referência para tratamento de câncer no Sul do Brasil, no período de Janeiro de 2011 a Março de 2012, encaminhadas por alterações clínicas e/ou citológicas, para diagnóstico e tratamento ou câncer de colo uterino já em tratamento.

Os critérios de inclusão foram mulheres, com câncer de colo uterino ou lesão precursora do CC com diagnóstico por biópsia ou conização, sendo critério de exclusão pacientes com doença autoimune, infecção de qualquer tipo ativa no momento da inclusão, hiv+ ou resultado da biópsia negativa para lesão de colo uterino. Foram divididas em 4 grupos sendo NIC1 54 casos, NIC2 72 casos, NIC3 145 casos e Câncer de colo uterino 93 casos, com base nos resultados de biópsia e/ou conização. Todas as pacientes eram submetidas a coleta de amostras de sangue e teste de HIV como rotina e parte deste sangue era reservado para posterior dosagem de MBL. Para a preparação do soro, as amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos de vidro, sem aditivos. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente durante 1 h após a coleta, após foi centrifugado e o soro foi armazenado a -20 ° C até serem analisadas.

5.2. Metodologia

As pacientes não foram testadas para HPV. Todas as pacientes eram submetidas a coleta de amostras de sangue pré operatório e HIV com rotina do serviço e parte deste sangue era reservado e separado em freezer a -20 graus Celsius,

As concentrações séricas de MBL foram dosadas nas pacientes, como descrito abaixo em detalhes.

Para a preparação do soro, amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos de vidro, sem aditivos. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente

durante 1 h após a coleta, centrifugado (2500 g, 4 ° C, 10 min.) E o soro foi removido e armazenado a -20 ° C até serem analisadas.

Este ensaio para a quantificação da MBL foi realizado com a colaboração da Universidade de Aarhus na Dinamarca através do Professor Jens Christians Jensenius. O método utilizado para a determinação do nível de MBL é um método de imunofluorescência a tempo resolvido (TRIFMA), que foi previamente descrito em detalhe (Frederiksen PD, 2006) . Após resfriamento à -96°C, foram acondicionadas e transportadas por via aérea por membro de nosso grupo pesquisadores. De maneira sucinta, a técnica empregou poços de microtitulação (FluoroNunc MaxiSorp, Nunc, Kamstrup, Denmark) revestidos com 1 µg de manose em 100 µL de tampão de bicarbonato de pH 9,6. Estes foram esvaziados e os locais de ligação dos resíduos de manose foram bloqueados pela adição de 200 µg de albumina de soro humano (HSA, Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) em 200 µL de “Tris-buffered saline - TBS” (10mMTris–HCl, 140 mM NaCl, 15 mM NaN₃, pH 7.4), TBS/HSA por poço, durante 1 hora a temperatura ambiente. As amostras de plasma foram diluídas 20 ou 100 vezes em tampão com alta concentração salina (20 mM Tris, 1 M NaCl, 0.05% (v/v) Triton X-100, 10 mM CaCl₂, 0.1% (w/v) HSA, pH 7,4) e adicionadas aos poços em duplicatas de 100 µL. As amostras foram incubadas a 4°C por 18h, os poços foram lavados 3 vezes antes da adição a 100 ng de anticorpo monoclonal anti-CRD (domínio de reconhecimento de carboidrato) de MBL conjugado com europium (Hyb 131-01, Antibody Shop, Copenhagen, Denmark) em 100 µL de TBS/Tween/25 µM EDTA (TBS contendo 0.05%(v/v) Tween 20, 25µM EDTA) por 1 hora em temperatura ambiente.

Após a lavagem, uma solução de aprimoramento (Perkin Elmer, Wallac) foi adicionada e os sinais aferidos por fluorimetria com tempo resolvido em um fluorômetro Delfia 1232 (Perkin Elmer,Wallac). O Hyb 131-01 foi marcado com íons de europium usando reagentes e procedimentos da Perkin Elmer. Isto proporciona o acoplamento do quelato de Eu³⁺ do N1-(p-isotiocianatobenzila) dietilenetriamina-N1, N2, N3-ácido tetra acético. O grupo DTTA (ácido dietilenetriaminotetraacetico) forma um complexo estável com os íons de europium e o grupo isotiocianato reage com os grupos de amins livres na proteínas, formando uma ligação covalente tioureia estável. Diluições de plasma padrão (3,6 µg MBL/ml) assim como amostras de MBL de baixa, média e alta concentração foram incluídas como controle interno em cada placa de microtitulação. As dosagens dos soros testes foram determinadas através de cálculo utilizando-se a curva padrão.

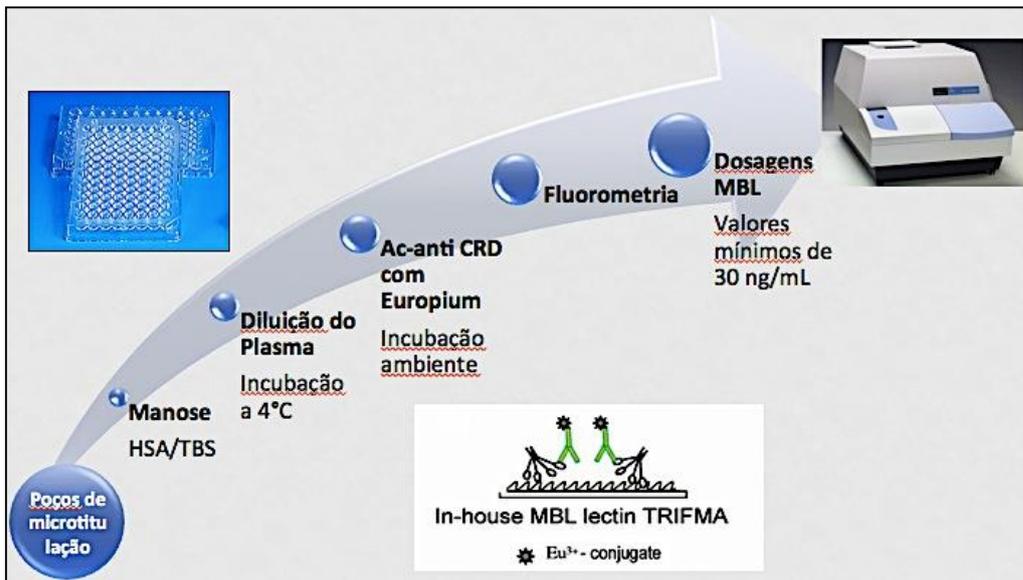


FIGURA 8 – Dosagem de MBL pelo método TRIFMA (Frederiksen PD, 2006)

5.3 Análise estatística

Foi utilizado o programa GRAPHPAD PRISM de análise estatística, a significância foi avaliada, utilizando os testes de Qui-quadrado (X^2), Mann-Whitney, Kruskal Wallis por se tratar de amostra, não paramétrica. A significância da associação de risco foram avaliadas com 5% como o valor de p crítico para as variáveis.

6. Resultados

Nós avaliamos 470 pacientes não grávidas, atendidas no HEG, foram divididas em 4 grupos, NIC1, NIC2, NIC3, e Câncer de colo uterino, todas submetidas a biópsia de colo uterino e/ou conização, ou histerectomia, quando foi feita conização e esta divergiu da biópsia foi considerado o diagnóstico de maior gravidade para inserção em um grupo de estudo. As pacientes de câncer foram avaliadas sem se considerar os diferentes estádios da doença. Foram excluídas pacientes que estavam sob diagnóstico ou tratamento de alguma infecção por avaliação clínica ou laboratorial inclusive 17 casos de HIV+, foram também excluídas pacientes sem biópsia conclusiva e pacientes com segunda neoplasia maligna, ficando 364 pacientes todas com diagnóstico histológico de lesão pré-maligna ou maligna do colo de útero. Distribuídas em NIC1=54, NIC2=72, NIC3=145 e Câncer de colo uterino = 93. Das 17 hiv+ que foram excluídas, 9 eram NIC3, 5 eram NIC2, 1 NIC1 e 1 Câncer.

A média de idade foi distinta entre os grupos sendo NIC1(30,6), NIC2(34,4), NIC3(34,28), e Câncer(48,25).

A distribuição de idade se dá conforme a tabela.

TABELA-2 VALORES DAS MÉDIA ETÁRIA E MEDIANAS DE CONCENTRAÇÃO EM ng/ml E NÚMERO DE CASOS

	NIC1	NIC2	NIC 3	CÂNCER
Número de casos	54	72	145	93
Mediana	1324	1104	1098	1452
Média de idade	30,64	34,42	34,29	48,45

As medianas das concentrações de MBL foram NIC1=1324, NIC2=1104, NIC3=1098, Câncer=1452 e não variaram de forma significativa como se pode observar no gráfico abaixo, tendo um $p=0,1133$ pelo teste de Kruskal-Wallis.

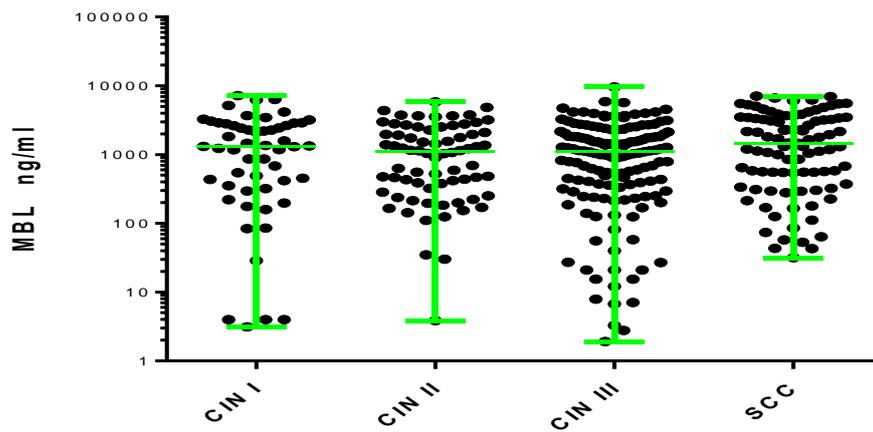


GRAFICO 1- CONCENTRAÇÃO DE MBL SEPARADAS POR ESTÁGIO DE DOENÇA

TABELA- 3 VALORES DAS MÉDIAS E MEDIANAS EM NG/ML E NÚMERO DE CASOS

	NIC1	NIC2	NIC 3	CANCER
Número de casos	54	72	145	93
Mediana	1324	1104	1098	1452

Quando separamos os grupos de grandes produtores de MBL e pouco produtores de MBL com o valor de corte em 500, que é um padrão para definirmos baixos produtores, (Eisen DP, 2008) (Dean MM, 2011). Isso não mostrou significância $p > 0.05$, pelo teste χ^2 como pode ser observado, pois todos os grupos se comportam da mesma forma com predomínio de grandes produtores.

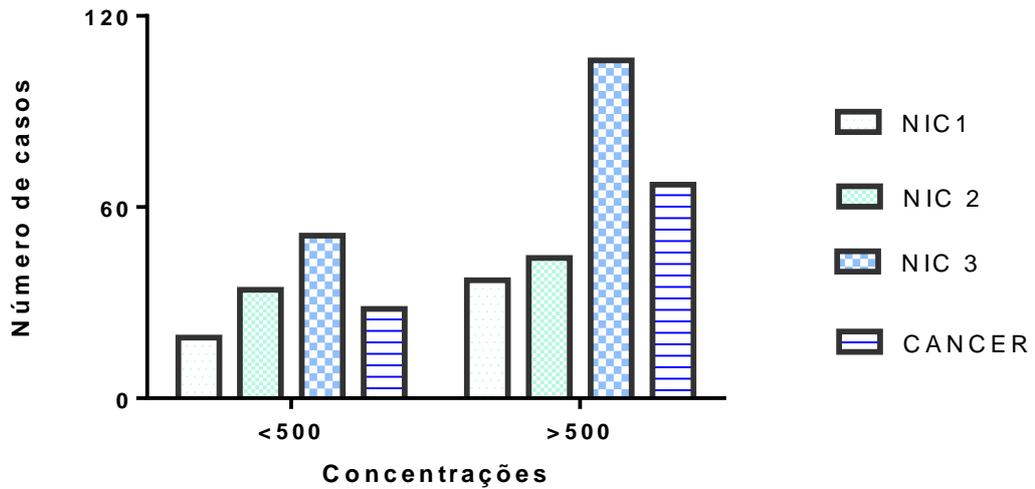


GRÁFICO 2- FREQUÊNCIA DE PACIENTES COM PRODUÇÃO DE MBL MAIOR E MENOR QUE 500G/ML.

Mesmo quando aumentamos o valor de corte para 1000 não observamos mudança significativas no comportamento da amostra, demonstrando se tratar de duas variáveis independentes.

Quando comparamos aqueles que produzem menos de 100 e mais de 1000, o comportamento nos 4 grupos é semelhante sem diferença estatística. Em publicação anterior mostramos que este comportamento já era visto entre pacientes com NIC 3 e pacientes sem evidencia de infecção pelo vírus HPV. (Ramos GP, 2013)

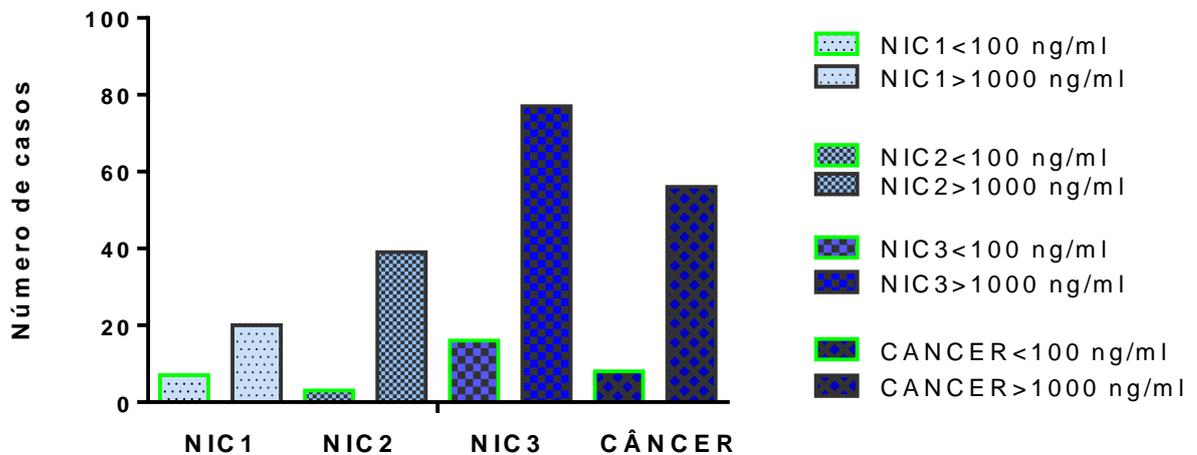
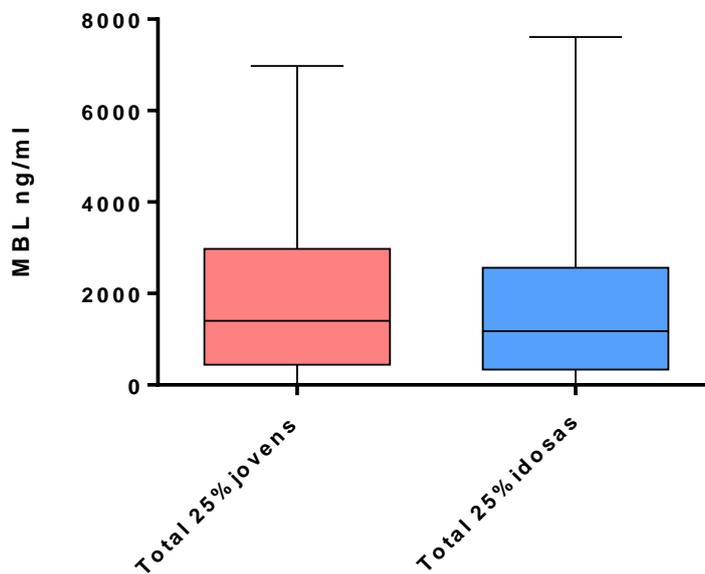


GRÁFICO 3 - FREQUÊNCIA DE DISTRIBUIÇÃO DE CASOS COM PRODUÇÃO SUPERIOR A 1000NG/ML E INFERIOR A 100NG/ML. TESTE CHI-QUADRADO P VALUE 0,1566

Quando dividimos em 2 grupos etários entre as 25% mais jovens e as 25% mais idosas para avaliarmos o impacto da idade na concentração de MBL em cada grupo, não houve diferenças significativas nos valores dentro de cada grupo diagnóstico pelo teste Mann-Whitney.

TABELA 4 – COMPARATIVO DA CONCENTRAÇÃO DA MBL DAS 25% MAIS JOVENS COM AS 25% MAIS IDOSAS DE CADA GRUPO

	CIN1	CIN2	CIN3	CC	Total
Media etária 25% Mais jovens	19,6	23,4	24,4	35,9	25,8
Media etária 25% Mais idosas	42,3	47,7	45,9	60,9	49,2
Mediana da dosagem de MBL (ng/ml) 25% Mais jovens	1772	1268	1238	2261	1403
Mediana da dosagem de MBL (ng/ml) 25% Mais idosas.	1386	920	992	1876	1190
Nível de significância, p=	0,422	0,863	0,833	0,730	0,309



Grupo das 25% mais jovens e mais 25% idosas p=0,2644

GRAFICO 4- COMPARATIVO DO TOTAL CONCENTRAÇÕES DE MBL ENTRE AS 25% MAIS JOVENS E AS 25% MAIS IDOSAS DE CADA GRUPO

7. Discussão

A busca de indicadores que possam prever a evolução e ou a persistência da infecção do HPV, já foi sugerida por muitos, uma vez que a morfologia por si só, não prediz qual lesão vai progredir ou regredir, sugerindo a necessidade de outros indicadores, para determinar o prognóstico individualmente nos pacientes (Rodriguez AC, 2010) (Östor, 1993). Com esse objetivo estudamos a relação entre a concentração da MBL e a evolução neoplásica da infecção do HPV, pois foi relatado por alguns autores a relação entre os portadores de genótipos que definem como pouco produtores de MBL e a aquisição da infecção do HPV (Segat I, 2009) (Tsai CC L. T., 2009).

A MBL humana é codificada por um gene designado MBL-2. Existem cinco polimorfismos conhecidos dentro da MBL-2 que pode afetar os valores de MBL no plasma. Estas mutações afetam a transcrição do complexo basal-promotor, o que reduz os níveis de circulação de MBL. Estudos têm mostrado que, em crianças e adultos, o polimorfismo do gene MBL-2 está relacionado com a susceptibilidade a várias infecções específicas demonstrando que os indivíduos com alelos variantes estão em um risco maior para infecção viral. (Tsai CC L. T., 2009) (Yuen MF, 1999) (Ip WK, 2004). No entanto, os resultados de outros estudos não suportam o que níveis de MBL, são um fator de risco para infecção viral. (Parrella P, 2007) (Malik S, 2003).

Segat et al sugere um aumento da susceptibilidade para a infecção HPV de alto risco pode ser conferida pela presença de polimorfismos funcionais no gene MBL2 que resulta numa diminuição da proteína níveis séricos. Esta redução de proteína circulante ativo poderia resultar em uma ligação inferior de MBL a IgA específica contra o HPV, assim limitando a ativação do complemento e favorecendo HPV propagação e evolução da doença (Segat I, 2009). Em nosso estudo não avaliamos o polimorfismo mas sim a concentração de MBL e identificando os produtores de altos e baixos níveis de MBL, e não observamos diferença de prevalência de doença entre os grupos com mais ou menos MBL plasmáticas. Este dado de não significância ($p=0,74$) também foi verificado em outro estudo que publicamos comparando a mediana dos níveis plasmáticos de MBL em pacientes com NIC3(912 ng/ml) com pacientes não infectadas pelo HPV(1201.3ng/ml) (Ramos GP, 2013).

Para iniciar seu ciclo de vida, um vírus deve se ligar a célula hospedeira e atravessar a membrana plasmática para ganhar acesso ao interior célula para a sobrevivência e replicação (García-Pineros AJ, 2006) (Kilpatrick, 2002). Como as células epiteliais não são boas apresentadoras de antígenos, o HPV permanece no interior das células epiteliais sem causar maiores danos (Diniz GC, 2009).

O HPV consegue através dos mecanismos já citados atrasar o reconhecimento pelo sistema imune por muito tempo. O ciclo infeccioso do HPV em si é um mecanismo para isso ocorra devido 1) Pouca viremia. 2) O HPV não é citolítico. 3) As células são fisiologicamente programadas para morrer, no processo de maturação do epitélio independente da infecção pelo HPV. 4) Não há nenhum sinal de inflamação e perigo para alertar o sistema imunológico. 5) A resposta mediada por interferon está diminuída, pelas proteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco (Pett MR, 2006) (Kanodia S, 2007). Com isso tudo o HPV efetivamente escapa da resposta imune inata atrasando a ativação da imunidade adaptativa. (Stanley M, 2010).

O fato de não observarmos diferenças significativas nas concentrações de MBL entre as idades nos diferentes grupos está de acordo com que Ytting e Ip observaram sobre alguns parâmetros, como horário da coleta do sangue, a idade, o sexo e o exercício físico não influenciam os perfis circulatórios de MBL e que estas características devem ser consideradas no potencial uso dessas moléculas como biomarcadores clínicos (Ytting H. C. I., 2007) (Ip WK, 2004).

O envelhecimento imunológico é um processo complexo que compreende muitas mudanças regulares e não, uma simples redução de mão única em todas as funções do sistema imunológico, assim todas as partes do sistema imunitário não são afetados de forma igual. Tem-se observado que as estruturas imunológicas naturais que são comuns a todos os seres superiores são menos afetados do que as estruturas que são adquiridas do sistema imunitário. A participação ativa da inflamação, que forma o mecanismo mais básico de defesa no processo de envelhecimento, é também um indicador disso. O declínio da função imune com a idade é reconhecida e apoiada por unanimidade pelos estudos epidemiológicos e clínicos (Burns EA, 2004) . Porém dentro da faixa etária que estudamos não observamos diferenças nas concentrações de MBL, talvez em grupos com idade muito mais superior isto poderia ser melhor avaliado. Isto está em sintonia com o observado por outros autores, que demonstram que os níveis séricos e plasmáticos são apenas marginalmente diferente, e foram independentes da idade e sexo. Os níveis circulantes de MBL são estáveis ao longo

do tempo em indivíduos saudáveis, o que é vantajoso para a sua aplicação potencial como biomarcadores (Ytting H. C. I., 2007). Isso é uma consideração importante pois a evolução desta doença está vinculada ao tempo de evolução e persistência da infecção do HPV (Ho GY, 1998) (BURD, 2003) (Doorslaer KV, 2010), mas os dados não sugerem que sofra influência de uma diminuição dos níveis séricos de MBL ao longo do tempo.

As concentrações mais elevadas no grupo de câncer de colo entendemos com um erro de seleção da amostra, onde muitos pacientes tinham estágio mais avançados com doença metastática, tendo um quadro de doença sistêmica grave e de necrose tecidual acentuada. MBL tem sido demonstrado que se ligam diretamente com as células apoptóticas e células necróticas, e facilitam sua eliminação (Nauta AJ, 2003).

Pacientes com câncer podem apresentar aumento da MBL como demonstrado em casos de câncer colorretal (CCR) independente do genótipo (Ytting H, 2011). Isto pode explicar em parte, a inconsistência dos resultados obtidos em estudos que comparam várias doenças autoimunes, cardiovasculares e metabólicas, quer concentrações de MBL ou ao genótipo MBL2. Investigar as concentrações séricas de MBL individual é muito estável em pessoas saudáveis ao longo do tempo e em pacientes com CCR, antes e depois de cirurgia (Ip WK, 2004) (Ytting H. C. I., 2006) (Ytting H. C. I., 2007). Os resultados do presente estudo sugerem de forma semelhante a outros autores, que o aumento da MBL advém de outros mecanismos de pós-transcrição. A MBL é sintetizada principalmente pelos hepatócitos (Dam & Brewer, 2010) (Kilpatrick, 2002). A MBL pode aumentar 2 a 3 vezes sobre processo infeccioso e inflamatório agudo (Thiel S, 1992) . No entanto, Ytting et al. sugere que os níveis elevados de MBL em pacientes com câncer seriam devido a um potencial mecanismo de aumento de armazenamento e / ou a liberação de MBL nestes pacientes, ou outra possibilidade seria que o metabolismo da MBL ser mais lento em pacientes com câncer, que conduz a concentrações elevadas de MBL na circulação. (Ytting H, 2011). Em estudos futuros sugerimos que apenas pacientes com câncer de colo de estadio 1(restrito ao colo) seja avaliados.

8. Conclusão

Os nossos dados não sustentam que níveis de MBL influenciam a infecção ou evolução da doença HPV induzida no colo uterino. Também demonstrou que a concentração não variou com a idade das pacientes estudadas. Levando-nos a pensar em outros fatores envolvidos, como as MASP's e citocinas. Novos estudos devem avaliar a influência do sistema complemento na evolução destas doenças.

Referências

- Abbas AK, L. A. (2003). *Cellular and Molecular Immunology*. 6th ed. Saunders .
- Akruddin J.M., R. A.-P. (2007). Chemokines, Cytokines, and Interleukins. *Blood*, 109(5): 1841–1849.
- Alexander JJ, A. A. (2008). The complement cascade: Yin–Yang in neuroinflammation , neuro–protection and –degeneration. *J Neurochem.* , December ; 107(5): 1169–1187.
- Biesecker G. (1983). Membrane attack complex of complement as a pathologic mediator. *Lab Invest*, 49: 237-249.
- Bosch FX, M. M. (1995). revalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.*, 7;87(11):796-802.
- Bosch FX., B. T. (2013). Comprehensive Control of Human Papilloma virus Infections. *Vaccine*, 31(S8),pp. I1-I31.
- Bosch XF, B. F. (2013). Comprehensive Control of Human Papilloma virus Infections. *Vaccine*, 31(S8),pp. I1-I31.
- Bouvard V, B. R.-T. (2010). A review of human carcinogens—Part B: Biological agents. *Lancet Oncol*, 10(4):321–322.
- Boyer, S. W. (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitinproteasome pathway. *Cancer research, Chicago*, v. 56, p. 4620-4624, 1996., v. 56, p. 4620-4624.
- BURD, E. (2003). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 1–17 Vol. 16, No. 1.
- Burns EA. (2004). Effects of aging on immune function. *J Nutr Health Aging.*, 8:9–18.
- Buzás EI, G. B. (2006). Carbohydrate recognition systems in autoimmunity. *Autoimmunity*, 39(8):691-704.
- Carter JJ, K. L. (2000). Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis.*, 181:1911–1919.
- Castellsagué X, a. M. (June de 2003). Chapter 3: Cofactors in Human Papillomavirus Carcinogenesis—Role of Parity, Oral Contraceptives, and Tobacco Smoking. *Future Directions in Epidemiologic and Preventive Research on Human Papillomaviruses and Cancer, J Natl Cancer Inst Monogr*, pp. (31): 20-28.
- Castle PE, S. M. (2009). Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade 2. . *Obstet Gynecol* , 113 (1): 18-25, 2009.

- Castle PE., W. S. (2002). A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *J Natl Cancer Inst*, 94:1406–14.
- CDC, C. f. (05 de outubro de 2014). *HPV-Associated Cancers Statistics*. Fonte: CDC: <http://www.cdc.gov/cancer/hpv/statistics/index.htm>
- Clifford GM, e. a. (2005). Cancer risk in the Swiss HIV Cohort Study: associations with immunodeficiency, smoking, and highly active antiretroviral therapy. . *J. Natl Cancer Inst.*, 97:425–432.
- Cordeiro J.C. (setembro de 2013). SNPS DA REGIÃO CONTROLADORA DE LOCUS (LCR) NA REGIÃO REGULADORA 5' DO GENE HLA-G EM MULHERES COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL. *Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná*. Curitiba, Paraná, Brasil: UFPR.
- Cruvinel WM, M. J. (2010). Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol*, 50(4):434-61.
- Dam, T., & Brewer, C. F. (2010). Lectins as pattern recognition molecules: The effects of epitope density in innate. *Glycobiology*, vol. 20 no. 3 pp. 270–279.
- Deacon JM, E. C. (2000). Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case–control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer* , 83:1565–72.
- Dean MM, F. R. (2011). Mannose-binding lectin deficiency influences innate and antigen-presenting functions of blood myeloid dendritic cells. *Immunology* . , Feb; 132(2): 296–305.
- Degn SE, H. A. (2009). MASP44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. *J Immunol*, 183:7371–8.
- Deligeoroglou E, G. A. (2013). HPV Infection: Immunological Aspects and Their Utility in Future Therapy. *Infect Dis Obstet Gynecol* . , 540850.
- Delves PJ, R. D. (2000). The Immune System – First of two parts. *N Engl J Med*, 343:37-50.
- Denny L, Q. M. (2006). Screening for cervical cancer in developing countries. *Chapter 8: Vaccine*, 24 3:S71–S77. .
- Diniz GC. (2009). VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV): ASPECTOS MOLECULARES, REAÇÃO IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO E BASES DO DESENVOLVIMENTO DA VACINA. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*, , v. 1, n. 3, p. 114 - 120,.
- Dobo J, e. a. (2009). MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity. . *J. Immunol*, 183:1207–1214.
- Doorbar J, Q. W. (2012). The biology and life-cycle of human papilloma viruses. *Vaccine*, 30(S5):F55–70.

- Doorslaer KV, B. R. (2010). Evolution of Human Papillomavirus Carcinogenicity. *Adv Virus Res*, 77: 41–62.
- Eisen DP, D. M. (2008). Low serum mannose-binding lectin level increases the risk of death due to pneumococcal infection. *Clin Infect Dis.*, 47:510–6.
- Falter KJ, M. F. (2013). Human Papillomavirus-associated Cancers as Acquired Immunodeficiency Syndrome Defining Illnesses. *Rare Tumors*, 5(2): 93–94.
- Faridi R, Z. A. (2011). Oncogenic potential of human papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. . *Virology Journal.* , 8, article 269.
- Franco EL. (1995). Cancer causes revisited: human papillomavirus and cervical neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.*, 87:779–780.
- Frank MM. (1989). Complement: a brief review. *J. Allergy Clin Immunol*, 84:411-20.
- Frederiksen PD, T. S. (2006). Quantification of mannan-binding lectin. *Journal of Immunological Methods*, 315, 49–60.
- García-Pineros AJ, H. A. (2006). Role of DC-SIGN in the activation of dendritic cells by HPV-16 L1 virus-like particle vaccine. . *Eur J Immunol.* , 36:437–445.
- Goodman MT, S. Y. (2008). Prevalence, acquisition, and clearance of cervical human papillomavirus infection among women with normal cytology: Hawaii Human Papillomavirus Cohort Study. . *Cancer Res.*, 68(21):8813–8824.
- Guimaraes V., G. R. (2008). Association between MBL2 gene functional polymorphisms and high-risk human papillomavirus infection in Brazilian women. *Human Immunology* , 69, 273–278.
- Hansch GM. (1988). *The complement attack phase. The complement system.* Berlin,,: Springer- Verlag, 202-30.
- Harper DM, F. E. (2004). Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet.*, 364:1757–1.
- Harro CD, P. Y. (2001). Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. . *J Natl Cancer Inst.* , 93:284–292. .
- Hasan UA, B. E. (2007). TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol.*, 178:3186–3197.
- Ho GY, B. R. (1998). Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. . *N. Engl. J. Med.* , 338(7):423–428.
- INCA. (18 de June de 2014). *Informativo vigilância do câncer.* Fonte: Portal do Inca (Instituto Nacional do Câncer):
http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/informativo_vigilancia_cancer_n3_2012.pdf
- INCA. (20 de June de 2014). *Programa Nacional de Controle Cancer Colo Utero.* Fonte: INCA (Instituto Nacional do Câncer):

http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_nacional_controle_cancer_colo_uterio/conceito_magnitude

- INCA-Tipos de câncer. (29 de June de 2014). *Inca - Tipos de cancer*. Fonte: INCA (Instituto Nacional do Cancer):
http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/definicao
- Ip WK, T. Y. (2004). Serum mannose-binding lectin levels and mbl2 gene polymorphisms in different age and gender groups of southern Chinese adults. *Scand J Immunol* , 59: 310–4.
- Iturry-Yamamoto GR, P. C. (2001). SISTEMA COMPLEMENTO: ATIVAÇÃO, REGULAÇÃO E DEFICIÊNCIAS CONGÊNITAS E ADQUIRIDAS. *Rev. Assoc. Med. Bras.* , vol.47 no.1 Jan./Mar. 41-51.
- Janeway CA, M. R. (2002). Innate immunity recognition. *Annu Rev Immunol*, 20:197-216.
- Kadish AS, P. T. (2002). Regression of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Loss of Human Papillomavirus (HPV) Infection Is Associated with Cell-mediated Immune Responses to an HPV Type 16 E7 Peptide. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 11; 483.
- Kaisho, T. S. (2003). Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors. *Curr. Mol. Med.* , 3: 373-385. .
- Kanodia S, F. L. (2007). Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets.*, 7:79–89.
- Kilpatrick, D. C. (2002). Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochim Biophys Acta*, 1572:401-13.
- Kitchener HC, C. P. (2006). Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine*, 24 3:S63–S70.
- Kjaera Tr, S. T. (2013). Toward a structure-based comprehension of the lectin pathway of complement. *Molecular Immunology*, 56 (2013) 222–231.
- Klingelhutz, A. F., & J.K., M. (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, v.380, p.79-82.
- Lacey JV Jr, B. L. (1999). Oral contraceptives as risk factors for cervical adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* , 8:1079–85.
- Landis SH, M. T. (1999). Cancer statistics, 1999. . *Cancer J Clin.* , 49:8–31.
- Law SKA, R. K. (1988). *Complement*. Oxford: Ilpress, 72 p.
- Lim HW. (1990). The complement system. Activation, modulation, and clinical relevance. *Dermatol Clin*, 8: 609-18.
- Ludovica Segat, S. C. (2009). MBL2 gene polymorphisms are correlated with high-risk human papillomavirus infection but not with human papillomavirus–related cervical cancer. *Human Immunology* 70, 436-439.

- MA., K. (1980). The human complement system: assembly of the classical pathway C3 convertase. . *Biochem J* , 189: 173-81. .
- Malik S, A. M. (2003). Absence of association between mannose binding lectin gene polymorphisms and HIV-1 infection in a Colombian population. *Immunogenetics* , 55:49-52.
- McCredie MR, e. a. (2008). Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol.*, May;9(5):425-34.
- McLaughlin-Drubin ME, a. M. (2008). Oncogenic Activities of Human Papillomaviruses. *Virus Res.* , 143(2): 195–208.
- Medzhitov R, J. C. (2000). Innate immunity. *N Engl J Med* , 343:338-44.
- Medzhitov R., H. P. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388:394-7.
- Moreno V, B. F. (2002). Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case–control study. *Lancet*, 359:1085–92.
- Münger K, H. P. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. . *Virus Research.* , 89(2):213–228.
- Nauta AJ, e. a. (2003). Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol* , 33: 2853–2863.
- NCI, N. C. (22 de 05 de 2014). *Cervical Cancer Screening* . Fonte: National Cancer Institute:
<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/screening/cervical/HealthProfessional>
- NCI, N. C. (29 de June de 2014). *National Cancer Institute: Comprehensive Cancer Information*. Fonte: National Cancer Institute at the National Institutes of Health: <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/cervical>
- Nevadunsky NS, K. I. (2012). Mannose-binding lectin codon 54 genetic polymorphism and vaginal protein levels in women with gynecologic malignancies. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.*, 163(2):216–2.
- Noris M, a. R. (2013). Overview of Complement Activation and Regulation. *Semin Nephrol. Nov 2013; 33(6): 479–492.*, 33(6): 479–492.
- Östor, A. (1993). Natural history of cervical intraepithelial neoplasia : a critical review. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, , 12, 186-192.
- Palefski, J. (1995). Human papillomavirus-associated malignancies in HIV-positive men and women. *Curr. Opin. Oncol.* 1995;7:437–441, 7:437–441.
- Palefsky JM. (2009). Anal cancer prevention in HIV-positive men and women. *Curr Opin Oncol.*, 21(5): 433–438.
- Parkin DM, B. F. (2005). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 55:74–108.

- Parrella P, S. D. (2007). Lack of association between genetic variants in the mannose-binding lectin 2 (mbl2) gene and HPV infection. *Eur J Epidemiol* , 22:159-62.
- Pett MR, H. M. (2006). Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. *Proc Natl Acad Sci USA* . , 103:3822–3827.
- Prendiville, W., & Davies, P. (2004.). *HPV handbook – 1: Human papillomavirus and cervical cancer*. Abingdon: Taylor & Francis,.
- Ramos GP, N. R. (2013). MBL serum concentration in women with HPV presenting CIN III lesions. *Human Immunology*, 74 (2013) 67–69.
- Ricklin D., H. G. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.*, 11, 785–797.
- Riedemann NC, W. P. (2003). Complement in Ischemia Reperfusion Injury. *American Journal of Pathology*, Vol. 162, No. 2, February 2003.
- Roden, R., & Wu, T. C. (2006). How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev Cancer*, 6(10): 753–763.
- Rodríguez AC, M. S. (2010). Longitudinal Study of Human Papillomavirus Persistence and Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2/3: Critical Role of Duration of Infection. *J Natl Cancer Inst.*, 102(5): 315–324.
- Rodriguez AC, S. M. (2010). Longitudinal Study of Human Papillomavirus Persistence and Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2/3: Critical Role of Duration of Infection. *J. Natl. Cancer Inst.* , 102(5):315–324.
- Rother K, T. G. (1988). *The complement system. 1ª ed. cap. Phases of The complement system. 1ª ed.* Berlin: Springer- Verlag, 1-4.
- Safaeian M, S. D. (2007). Cervical Cancer Prevention - Cervical Screening: Science in Evolution. *Obstet Gynecol Clin North Am.* , 34(4): 739–ix., 34(4):739-60.
- Segat I, C. S. (2009). MBL2 gene polymorphisms are correlated with high-risk human papillomavirus infection but not with human papillomavirus–related cervical cancer. *Human Immunology* , 70 436-439.
- Sellors JW, S. R. (2003). *Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Beginners' Manual*. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Silva WD, K. T. (1984). Sistema complemento: um engenhoso mecanismo bioquímico, um co-participante na defesa natural e um mediador de interações celulares. *Rev Ass Med Brasil* , 30: 67-72.
- Smith JS, L. L. (2007). Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int. J. Cancer*, 121(3):621–632.
- Solomon D, S. M. (2000). Women and Health. *Academic Press*,; 942–8.
- Stanley M. (2010). HPV - immune response to infection and vaccination. *Infect Agent Cancer.* , 5: 19.

- Stoler MH, S. M. (2001). Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance-Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS) Group: Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histol. interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage stud. *JAMA* , 285 (11): 1500-5.
- Surveillance Research Program, N. (29 de June de 2014). *SEER Stat Fact Sheets: Cervix Uteri Cancer*. Fonte: The SEER Website: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/cervix.html>
- Syrjänen, k. (1996). Spontaneous evolution of intraepithelial lesions according to the grade and type of the implicated human papillomavirus (HPV). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 65(1):45-53.
- Takahashi M, D. I. (2008). Mannose-Binding Lectin (MBL)-Associated Serine Protease (MASP)-1 Contributes to Activation of the Lectin Complement Pathway. *The Journal of Immunology*, vol. 180 no. 9 6132-6138.
- Takahashi M, I. Y. (2010). Essential role of mannose-binding lectin-associated serine protease-1 in activation of the complement factor D. *J Exp Med*, Jan 18;207(1):29-37.
- Takahashi M., I. D. (2008). Mannose-Binding Lectin (MBL)-Associated Serine Protease (MASP)-1 Contributes to Activation of the Lectin Complement Pathway. *The Journal of Immunology*, vol. 180 no. 9 6132-6138.
- Thiel S, H. U. (1992). The concentration of the C-typelectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clin Exp Immunol* , 90: 31–35.
- Thiel S., J. L. (2012). Mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1), a serine protease associated with humoral pattern-recognition molecules: normal and acute-phase levels in serum and stoichiometry of lectin pathway components. *Clin Exp Immunol*, Jul;169(1):38-48.
- Tsai CC, L. T. (2009). Mannose-binding lectin in high-risk human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol*, 200:618.e1-618.e6.
- Tsai CC, L. T.-M.-L., & Eng, H.-L. (2009). Mannose-binding lectin in high-risk human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol*, 200:618.e1-618.e6.
- Turner MW. (2003). The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol*, 40:423–9.
- Vasta, G. R. (2009). Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol*, 7:424–438.
- Villa LL, C. R. (2005). Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *lancet oncology*, May;6(5):271-8.
- Villiers EM. (jun de 1989). Heterogeneity of the Human Papillomavirus Group. *Journal of Virology*,, 4898-4903.
- Villiers EM. (2001). Taxonomic Classification of Papillomaviruses. *Papillomavirus Report.*, 12:57–63.

- Ward PA, G. R. (2012). Manipulation of the Complement System for Benefit in Sepsis. *Crit Care Res Pract.* , 2012: 427607.
- WHO, I. (29 de June de 2014). *Cancer Fact Sheets*. Fonte: Globocan 2012:estimated cancer incidence and prevalence worldwide 2012: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
- Williams LW, B. A. (1988). Complement: function and clinical relevance. *Ann Allergy* , 60: 293-301.
- Woodman CB, C. S. (2001). Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet*, 357:1831–6.
- Yamamoto K, M. S. (1983). Mechanisms for the spontaneous formation of covalently linked polymers of the terminal membranolytic complement protein (C9). . *J Biol Chem*, 258: 7887-9.
- Ytting H, C. I. (2011). Mannan-Binding Lectin (MBL) and MBL-Associated Serine Protease 2 (MASP-2) Genotypes in Colorectal Cancer. *Scandinavian Journal of Immunology*, Volume 73,, pages 122–127.
- Ytting H., C. I. (2006). Influence of major surgery on the mannan-binding lectin pathway of innate immunity. *Clin Exp Immunol*, 144:239–46.
- Ytting H., C. I. (2007). Biological variation in circulating levels of mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 and the influence of age, gender and physical exercise. *Scand J Immunol.*, Oct;66(4):458-64.
- Yuen MF, L. C. (1999). Mannosebinding lectin gene mutations are associated with progression of liver disease in chronic hepatitis B infection. . *Hepatology* 1999;29: 1248-51., 29: 1248-51.
- Zeferino LC, P. J. (2006). Organization of cervical cancer screening in Campinas and surrounding region, São Paulo State, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, vol.22 n.9.
- Zhang B, S. D. (2002). E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. . *Journal of Virology.*, 76(1):220–231.
- Zhang N, M. Z. (2013). Association of Levels of Mannose-Binding Lectin and the MBL2 Gene with Type 2 Diabetes and Diabetic Nephropathy. *PLoS ONE*, 8(12): e83059.
- Ziccardi RJ. (1983). Nature of the metal ion requirement for assembly and function of the first component of human complement. *J Biol Chem*, 258:6187-92.
- Zur Hausen H. (1977). Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 78:1–30.
- Zur Hausen H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer.*, 2(5):342–350.

Anexos

ANEXO 1 – Dosagem e Quantificação da MBL Sérica por *TRIFMA* (Ensaio Imunofluorométrico a tempo resolvido).

Ensaio da Lectina: O ensaio é baseado na ligação de MBL com o ligante manose, revestido em placa de 96 poços e a detecção da ligação de MBL com MAb anti-MBL marcada com Europium.

Métodos:

1. Prepare 10 µg manose/ml em Tampão de revestimento (Coatingbuffer pH 9.6)
2. Distribua a solução em uma placa de 96 poços e deixe as placas revestirem overnight em temperatura ambiente com a manose.
3. A placa é esvaziada e preenchida com 200 µl de TBS/HSA 1 mg/ml para bloqueio por uma hora em temperatura ambiente.
4. A placa é lavada 3 vezes com TBS/Tween na lavadora de placas.
5. Misture as amostras, o pool de standard (soro com concentrações conhecidas) e os controles em um mixer para fazer a diluição.
6. Dilua os controles e amostras 1/100 em Tampão ROSA (Tampão salino).
7. Para a curva standard diluir primeiro 1/20 e de maneira sucessiva 3.5 vezes, totalizando 8 amostras. 1/20, 1/70, 1/245...
8. Todas as amostras são adicionadas em duplicatas, inclusive os standards e controles. Primeiro adicione os standards nos 16 primeiros poços, e então somente Tampão ROSA nos próximos dois, nos próximos 8 poços os controles e finalmente as amostras. (35 amostras por placa).
9. Incubar a placa com amostras a 4°C overnight.
10. A placa é lavada 3 vezes com TBS/Tween/Ca²⁺ na lavadora de placas e então incubada por 2 horas em temperatura ambiente com Biotina (hyb 131-1) diluída em TBS/Tween/Ca²⁺
11. A placa é lavada 3 vezes com TBS/Tween/Ca²⁺ na lavadora de placas e então incubada com Solução Enhancement por uma hora.
12. A placa é colocada em agitação por 5 minutos em uma agitadora de placas.
13. Leia a contagem por fluorometria DELFIA-reader da Perkin Elmer – Victor3).



Curitiba, 10 de Maio de 2012.

Carlos Alfonso Maestri
Pesquisador Responsável

Prezado (a) Pesquisador,

Gostaríamos de informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da Liga Paranaense de Combate ao Câncer/Hospital Erasto Gaertner no dia 10 de maio de 2012, aprovou o documento citado abaixo referente ao estudo clínico intitulado como: "Avaliação da importância da concentração plasmática da lectina ligante de manose (mbl) na evolução das pacientes com lesões de alto e baixo grau de colo uterino", cujo número de protocolo é P.P. n° 2168

- Durante a coleta de dados observamos a necessidade incluir alguns casos de lesões já confirmadas com câncer de colo uterino, para avaliar valores de MBL nestes casos que são extremos. Estas pacientes terão o soro de seu sangue que foi colhido para exames de rotina, no laboratório do hospital Erasto Gaertner, e é desprezado após uma semana, avaliado para concentração de MBL. Esta avaliação não acarretará nenhum custo ao paciente e instituição, não atrasará seu tratamento nem o funcionamento do laboratório, a análise será feita em pacientes que já colheram sangue para sua rotina habitual, estes valores servirão como casos controles de doença
- As lesões de baixo grau são pouco prevalentes no nosso hospital, para tanto necessitaremos acrescentar casos oriundos da minha clínica particular com diagnóstico de nic 1 (lesão de baixo grau), os quais serão incluídos com o mesmo rigor dos casos recrutados no hospital Erasto Gaertner.

Sem mais para o momento, agradecemos à atenção e colocamo-nos a disposição para maiores esclarecimentos.

Atenciosamente,

Coordenador do CEP
Dr. Jordan Zanetti Silva

Dr. Jordan Zanetti Silva
Coord. CEP do Hospital Erasto Gaertner
E-mail: jzanetti@erasto.com.br
Fone: (41) 333-1111

Membros do CEP:

Aline R. Cruz de Souza - Bioquímica	Juliano Dugonski - Farmacêutico
Andrei Leite de Moraes - Médico	Márcia Bobak - Enfermeira
Dinarte Orlandi - Estatístico	Marina Lopes - Nutricionista
Edenice de Oliveira Santana - Enfermeira	Paola B. Bettega - Psicóloga
Elaine Ricarda Machado - Enfermeira	Patrícia Blasco Silva - Nutricionista
Janice Gastoldon Voluntária da Rede Feminina	Priscila L. Leite Silva - Farmacêutica
Jeanine Marie Nardin - Farmacêutica	Priscila F. Fabro - Psicóloga
Jordan Zanetti Silva - Médico	Rosane do Rocio Johnsson - Médica
José Carlos Wiederkehr - Adm de Empresas	Wanda Aparecida S. de Moraes - Membro da Comunidade



Curitiba, 29 de Outubro de 2013.

Carlos Alfonso Maestri
Pesquisador Responsável

Prezado (a) Pesquisador,

Gostaríamos de informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da Liga Paranaense de Combate ao Câncer/Hospital Erasto Gaertner no dia 29 de Outubro de 2013, aprovou o documento citado abaixo referente ao estudo clinico intitulado como: **"Avaliação da importância da concentração plasmática da lectina ligante de manose (mbl) na evolução das pacientes com lesões de alto e baixo grau de colo uterino"**, cujo número de protocolo é P.P. nº 2168

- Segunda Emenda do P.P 2168.

Sem mais para o momento, agradecemos à atenção e colocamo-nos a disposição para maiores esclarecimentos.

Atenciosamente,

Coordenador do CEP
Dr. Jordan Zanetti Silva

Dr. Jordan Zanetti Silva
Coordenador do Comitê de
Ética em Pesquisa
HEG - L.P.C.C. - CRM-PR 14 457

Membros do CEP:

Aline R. Cruz de Souza - Bioquímica	Juliano Dugonski - Farmacêutico
Andrei Leite de Moraes - Médico	Márcia Bobak - Enfermeira
Dinarte Orlandi - Estatístico	Marina Lopes - Nutricionista
Edenice de Oliveira Santana - Enfermeira	Paola B. Bettega - Psicóloga
Elaine Ricarda Machado - Enfermeira	Patricia Blasco Silva. - Nutricionista
Janice Gastoldon Voluntária da Rede Feminina	Priscila L. Leite Silva - Farmacêutica
Jeanine Marie Nardin - Farmacêutica	Priscila F. Fabro - Psicóloga
Jordan Zanetti Silva - Médico	Rosane do Rocio Johnsson - Medica
José Carlos Wiederkehr - Adm de Empresas	Wanda Aparecida S. de Moraes - Membro da Comunidade