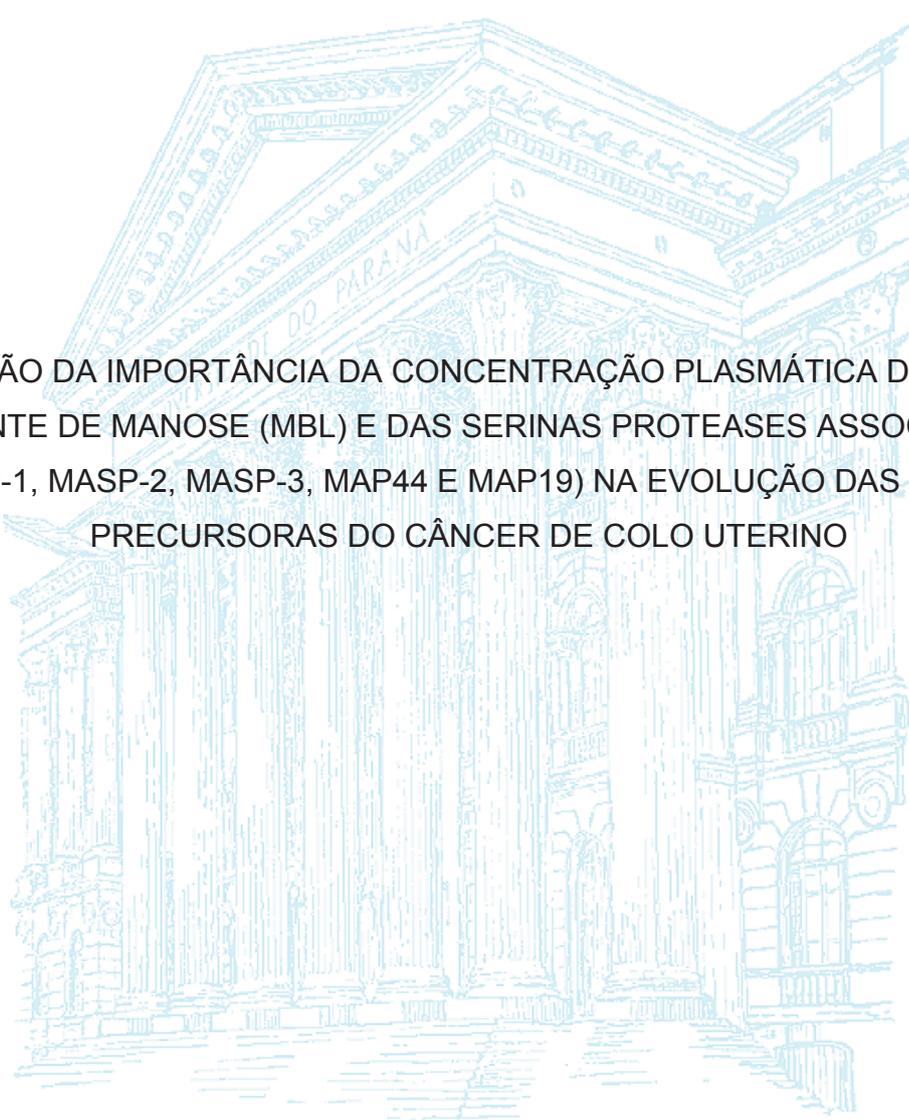


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARLOS AFONSO MAESTRI



AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DA LECTINA  
LIGANTE DE MANOSE (MBL) E DAS SERINAS PROTEASES ASSOCIADAS  
(MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAP44 E MAP19) NA EVOLUÇÃO DAS LESÕES  
PRECURSORAS DO CÂNCER DE COLO UTERINO

CURITIBA

2019

CARLOS AFONSO MAESTRI

AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DA LECTINA  
LIGANTE DE MANOSE (MBL) E DAS SERINAS PROTEASES ASSOCIADAS  
(MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAP44 E MAP19) NA EVOLUÇÃO DAS LESÕES  
PRECURSORAS DO CÂNCER DE COLO UTERINO

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em  
Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de  
Ciências da Saúde, Universidade Federal do  
Paraná, como parte das exigências para a  
obtenção do título de Doutor em Medicina Interna e  
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Newton Sérgio Carvalho

Coorientadores: Prof. Dr. Renato Mitsunori Nisihara

Profa. Dra. Iara Taborda Messias  
Reason

CURITIBA

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA  
JORDÃO CRB 9/991 COM OS DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Maestri, Carlos Afonso

Avaliação da importância da concentração plasmática da lectina ligante de manose (MBL) e das serinas proteases associadas (MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAP44 e MAP19) na evolução das lesões precursoras do câncer de colo uterino. / Carlos Afonso Maestri – Curitiba, 2019.

84 f.. : il.

Orientador: Prof. Dr. Newton Sérgio Carvalho.

Coorientador: Prof. Dr. Renato Mitsunori Nisihara.

Coorientadora: Profa. Dra. Iara Tabora Messias Reason.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

1.Complemento. 2.Papilomavírus humano. 3.Neoplasia intra-epitelial Cervical. 4.Colo do útero. 5.Neoplasias. I.Carvalho, Newton Sérgio. II. Nisihara, Renato Mitsunori. III. Reason, Iara Tabora Messias. IIV. Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde.Universidade Federal do Paraná. III.Título. NLMC: WP 480



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E  
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

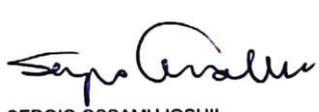
## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CARLOS AFONSO GARCEZ MAESTRI** intitulada: **AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DA LECTINA LIGANTE DE MANOSE (MBL) E DAS SERINAS PROTEASES ASSOCIADAS (MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAP44 E MAP19) NA EVOLUÇÃO DAS LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER DE COLO UTERINO**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 12 de Abril de 2019.

  
NEWTON SERGIO DE CARVALHO  
Presidente da Banca Examinadora

  
ADRIANA BITTENCOURT CAMPANER  
Avaliador Externo (FCMSCSP)

  
SERGIO OSSAMU IOSHII  
Avaliador Externo (UFPR /DPB)

  
RENATE VON LINSINGEN  
Avaliador Externo (UFPR.)

  
JAN PAWEŁ ANDRADE PACHNICKI  
Avaliador Externo (FEPAR)

Aos meus pais, pelo esforço em me dar uma boa educação e formação moral que serviram de base para minha vida.

Aos meus 3 filhos, Vinícius, Thiago e Isabela que optaram em ser médicos, tendo pleno conhecimento que será um ato de estudo contínuo, diário e incessante para se atingir um nível de qualificação realmente útil a sociedade.

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

Aos meus professores pela paciência e abnegação.

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

Para todos os pesquisadores, que iniciam suas pesquisas e depois de muitas dificuldades pensam em desistir, pensei muitas vezes quase diariamente, mas a persistência e a fé que estava fazendo o certo me fizeram chegar até aqui.

Aos meus colegas médicos que trabalham duramente no atendimento de pacientes clínicas e hospitais e não acreditam que possam alcançar um doutorado, para que sirva de exemplo a eles, que sempre é possível ir adiante, independente de onde está, ou de quando inicia sua jornada.

## **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 tese 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 Nisihara um dedicado pesquisador que certamente é um dos maiores que esta cidade já conheceu, orientador e certamente agora amigo para toda vida.

Aos Colegas que me ajudam diariamente nos atendimentos destes pacientes, Dr José Clemente Linhares, um exemplo de profissional que muito influenciou minha carreira, Dra. Fernanda V. Fonseca, sócia e companheira de inúmeros desafios, Dra. Natasha Araujo, Dra. Sabrina Godoy médicas e amigas fundamentais para tudo isso acontecer.

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 a professora Iara Taborda Messias Reason, 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 e Dr. Sergio Bruno Hatschbach, dois dos maiores professores que tive a satisfação de conhecer, não só agradeço as orientações, mas principalmente os exemplos de conduta profissional e ética que me deram.

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar as concentrações séricas de lectina ligante de manose (MBL) e as proteases serínicas associadas à MBL (MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAp-44 e MAp-19) em mulheres com diferentes lesões cervicais associadas ao vírus do papiloma humano (HPV) e sua evolução, e avaliar suas distribuições nas diferentes faixas etárias. **Sujeitos e Métodos:** Um total de 364 mulheres, que foram submetidas a triagem para câncer de colo de útero ou tratamento no Hospital de Câncer Erasto Gaertner (HEG), Curitiba, região Sul, Brasil, foram incluídos no estudo. Com base nos últimos resultados da biópsia guiada por colposcopia, as mulheres foram divididas em quatro grupos: As 3 neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC), NIC I, NIC II, NIC III e neoplasia invasiva. O ensaio imunofluorométrico de resolução no tempo (TRIFMA) foi utilizado para medir as concentrações de MBL no soro. A análise estatística foi feita usando o GraphPad Prism 6.0. As comparações foram realizadas por Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e analisadas pelo teste do qui-quadrado; variáveis contínuas são apresentadas como variáveis medianas e categóricas como frequências. **Resultados:** A mediana da concentração de MBL em ordem decrescente foi: Câncer : 1452 ng / ml; NIC I: 1324 ng / ml; NIC II: 1104 ng / ml e NIC III 1098 ng / ml. No entanto, não houve significância estatística entre os quatro grupos com lesões associadas ao HPV ( $p = 0,11$ ). Pacientes com câncer apresentaram níveis séricos de MASP-2, MASP-1 e MAp-19 significativamente mais elevados que os demais grupos ( $p < 0,0001$ ;  $p = 0,012$ ;  $p = 0,025$ , respectivamente). Não houve diferenças estatisticamente significativas nos níveis séricos de MASP-3 e MAp-44 entre os quatro grupos estudados. Além disso, altos níveis séricos de MASP-2, MASP-1 e MAp-19 foram significativamente associados com sobrevida ruim em pacientes com câncer e recidiva ( $p = 0,002$ ,  $p = 0,0035$  e  $p = 0,025$ , respectivamente). **Conclusão:** Neste estudo, não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos de MBL entre os grupos com neoplasia intraepitelial cervical. Os altos níveis séricos MASP-2, MASP-1 e MAp-19 foram associados à progressão do câncer do colo do útero e pior prognóstico da doença. Esses novos achados demonstram o envolvimento das serina proteases da via da lectina na patogênese do câncer do colo do útero e futuras investigações devem esclarecer seu papel no processo da doença.

**Palavras-chave:** Complemento. Papillomavírus humano. Neoplasia intra-epitelial cervical. Câncer cervical. Masp-1. Masp-2.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate serum concentrations of mannose-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine proteases (MASP-1, MASP-2, MASP-3, MASP-4 and MASP-19) in women with different cervical lesions associated with human papillomavirus (HPV) and its evolution, and to evaluate its distributions in the different age groups.

**Subjects and Methods:** A total of 364 women, who were screened for cervical cancer or treatment at the Erasto Gaertner Cancer Hospital (HEG), Curitiba, Brazil, were included in the study. Based on the latest results of cervical colposcopy-guided biopsy, women were divided into four groups: 3 cervical intraepithelial neoplasia (CIN), CIN CIN II, CIN III, invasive neoplasia, and I. The time resolution immunofluorometric assay (TRIFMA) was used to measure serum MBL concentrations. Statistical analysis was done using GraphPad Prism 6.0. The comparisons were performed by Kruskal-Wallis, Mann-Whitney and analyzed by the chi-square test; continuous variables are presented as median and categorical variables as frequencies.

**Results:** The median MBL concentration in descending order was: Cancer: 1452 ng / ml; CIN I: 1324 ng / ml; CIN II: 1104 ng / ml and CIN III 1098 ng / ml. However, there was no statistical significance among the four groups with HPV-associated lesions ( $p = 0.11$ ). Patients with cancer had significantly higher serum levels of MASP-2, MASP-1 and MASP-19 than the other groups ( $p < 0.0001$ ,  $p = 0.012$ ,  $p = 0.025$ , respectively). There were no statistically significant differences in serum levels of MASP-3 and MASP-4 among the four groups studied. In addition, high serum levels of MASP-2, MASP-1 and MASP-19 were significantly associated with poor survival in patients with cancer and recurrence ( $p = 0.002$ ,  $p = 0.0035$  and  $p = 0.025$ , respectively).

**Conclusion:** In this study, there was no statistically significant difference in serum levels of MBL among the groups with cervical intraepithelial neoplasia. High serum levels of MASP-2, MASP-1 and MASP-19 were associated with cervical cancer progression and worse prognosis of the disease. These new findings demonstrate the involvement of lectin pathway serine proteases in the pathogenesis of cervical cancer and further investigations should clarify their role in the disease process.

**Keywords:** Complement. Human papillomavirus. Cervical intraepithelial neoplasia. Cervical cancer. Masp-1. Masp-2.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl	-	Microlitro
x <sup>2</sup>	-	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,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
CIN	-	Cervical intraepitelial neoplasia
CLM	-	Complexo lítico de membrana
CO <sub>2</sub>	-	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
HIV	-	Vírus da imunodeficiência Humana
HPV	-	Papillomavirus 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- $\beta$	-	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- $\alpha$	-	Fator de necrose tumoral - alfa
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná
URR	-	Região reguladora do Vírus HPV
VLP	-	“Vírus like particule”, partícula semelhante ao vírus
VL	-	Via das lectinas
WHO	-	World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- INCIDÊNCIA E MORTALIDADE DE CANCER EM ALGUMAS CIDADES BRASILEIRAS.....	20
FIGURA 2- HISTÓRIA EVOLUTIVA DO CÂNCER DE COLO UTERINO. ....	26
FIGURA 3- MECANISMO DA CARCINOGENESE POR HPV. ....	28
FIGURA 4 - ESQUEMA RESUMIDO DA ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO. ....	39
FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DOS 4 GRUPOS DE ESTUDO, DE ACORDO COM PRODUTORES ALTOS (> 1.000 NG / ML) E DEFICIENTES (<100 NG / ML) DE LECTINA LIGADA À MANOSE. P = 0,774 (T2 TESTE). NIC I, II, III NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL, GRAUS 1, 2 E 3; CARCINOMA INVASOR (SCC) .....	73

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- TIPO DE HPV E DOENÇA ASSOCIADA.....	23
TABELA 2- RESUMO DA HISTÓRIA NATURAL DA NIC.....	25
TABELA 3- CÉLULAS E MOLÉCULAS SOLÚVEIS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO .....	34
TABELA 4 - PERFIL DO PACIENTE E VALORES DA MEDIANA DE CONCENTRAÇÕES DE SÉRICA DE LECTINA DE LIGANTE DE MANOSE (MBL) ENTRE OS 4 GRUPOS DE LESÕES CERVICAIS ASSOCIADAS A VÍRUS DE PAPILOMA HUMANO.....	73
TABELA 5- CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAP-44 E MAP-19 EM PACIENTES COM LESÕES CERVICAIS E CÂNCER.....	74
TABELA 6- ASSOCIAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAP-44 E MAP-19 E EVOLUÇÃO CLÍNICA EM PACIENTES COM LESÕES CERVICAIS.....	75

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
4.1	CARCINOMA DE COLO UTERINO E SUAS LESÕES PRECURSORAS .....	18
4.1.1	Epidemiologia.....	18
4.1.2	Importância da histopatologia e classificação citológica.....	20
4.1.3	Fatores de risco.....	21
4.1.4		
4.2	PAPILLOMAVIRUS HUMANO.....	22
4.2.1	História natural e ciclo de vida do HPV .....	24
4.2.2	Oncogênese do HPV.....	27
4.2.3	Resposta imune do hospedeiro contra o HPV.....	28
4.2.4	Mecanismos de fuga do vírus HPV do sistema imunológico .....	30
4.2.5	Vacinação e a resposta vacinal contra HPV.....	30
4.2.6	Mecanismos de proteção induzida pela vacina .....	31
4.3	SISTEMA IMUNOLÓGICO .....	32
4.3.1	Imunidade inata.....	32
4.3.2	Imunidade adaptativa.....	33
4.3.3	Sistema complemento .....	34
4.3.3.1	Via clássica .....	34
4.3.3.2	Via alternativa.....	36
4.3.3.3	Via das lectinas .....	37
4.4	MBL.....	40
4.4.1	Evidências da Interação da MBL e HPV.....	41
4.4.2	MASPS.....	42
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	44
5.2	MÉTODOS.....	45
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47

<b>6</b>	<b>PRIMEIRO ARTIGO PUBLICADO : MANNOSE BINDING LECTIN IS NOT ACTING AS A BIOMARKER FOR THE PROGRESSION OF PRE-INVASIVE LESIONS OF INVASIVE CERVICAL CANCER .....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>SEGUNDO ARTIGO PUBLICADO : MASP-1 AND MASP-2 SERUM LEVELS ARE ASSOCIATED WITH WORSE PROGNOSTIC IN CERVICAL CANCER PROGRESSION.....</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>ILUSTRAÇÕES DOS ARTIGOS PUBLICADOS .....</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>76</b>

## 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%(LANDIS, 1999; SAFAEIAN; SOLOMON, 2007;). Esse declínio é atribuído principalmente à introdução do teste de Papanicolau na década de 1940. A implementação de programas de rastreamento citológico organizados e bem coordenados, como os programas da Escandinávia e Inglaterra conseguiram uma diminuição além de 50 % na incidência e na mortalidade do câncer de colo uterino(KITCHENER; CASTLE; COX, 2006). Entretanto, Safaeian e Solomon (2007), mostram que a citologia por si só não é suficiente para prever quais serão os casos que evoluirão para câncer de colo de útero, e apresenta índice de falsos negativos consideráveis.

Num outro lado deste enigma está o sistema imunológico do hospedeiro. A inflamação crônica no microambiente tumoral e a evasão da resposta imune antitumoral são duas das características necessárias para a oncogênese e a progressão do câncer(ABBAS; JANAWAY JR, 2000). O sistema imunológico inato não apenas desempenha um papel crítico na perpetuação dessas características promotoras de tumores, mas também no desenvolvimento de respostas imunes adaptativas antitumorais. Assim, a compreensão do duplo papel do sistema inato na imunologia do câncer é necessária para o desenho de estratégias combinadas de imunoterapia capazes de combater tumores estabelecidos(BERRAONDO et al. 2016).

Até o momento, nenhum estudo abordou a via das Lectinas incluindo as MASPs e a MBL, em relação à neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e carcinoma do colo uterino. Nosso grupo de pesquisa havia relatado anteriormente as concentrações de MBL em mulheres com lesões cervicais associadas ao HPV, mostrando que não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações séricas médias de MBL em mulheres com lesões NIC I, NIC II, NIC III), ou câncer do colo do útero(MAESTRI et al., 2017).

Desde quando foi estabelecida a relação entre o HPV e o câncer de colo de útero, se percebeu que deveria haver algum fator coadjuvante que permitiria que apenas um pequeno percentual das mulheres infectadas, evoluiria para o câncer de colo uterino. Muitos acreditam que a chave esteja em uma resposta defeituosa do sistema imunológico para essas pacientes. Aqui procuramos discutir e demonstrar o papel de parte da via das lectinas, na infecção do HPV e sua evolução para câncer de colo de útero.

## 2 JUSTIFICATIVA

Östor sugere (1993) 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.

Paralelo a isto outros pesquisadores como Rodriguez et al(2010) propoem a busca de biomarcadores que influenciem na persistência da infecção pelo HPV. A identificação de biomarcadores que possam apontar 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.

### **3 OBJETIVOS**

Neste estudo transversal o objetivo principal foi de dosar as concentrações de MBL, MASP-1, MASP-2 e MASP-3, Map19 e MAp44 em mulheres divididas em 4 grupos, pacientes com NIC I, NIC II, NIC III, e câncer de colo uterino, verificando se há algum tipo de relação entre as concentrações plasmáticas e a evolução das neoplasias epiteliais cervicais.

Como objetivos secundários avaliar as distribuições das concentrações entre as diferentes faixas etárias, e a evolução dos casos por um período de mínimo de 4 anos relacionado as dosagens.

## 4 REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 CARCINOMA DE COLO UTERINO E SUAS LESÕES PRECURSORAS

#### 4.1.1 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 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(BURD, 2003).

#### 4.1.2 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(DOORSLAER BURK, 2010; DOORBAR et al., 2012;BOSCH et al., 2013).

Atualmente 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(STANLEY, 2010).

Nos Estados Unidos da América (EUA), o risco de desenvolver o CC é de aproximadamente 0,7 % no decorrer da vida, em 2015 tivemos 12.845 casos novos e 4.175 óbitos por CC. O número de novos casos de câncer de colo do útero foi de 8

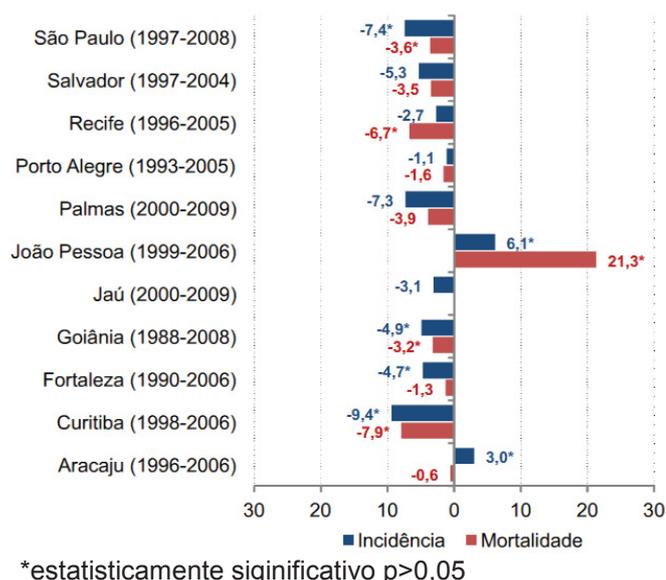
por 100.000 mulheres por ano. O número de mortes foi de 2,3 por 100.000 mulheres por ano(U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2017).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, o CC 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. 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(INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2013).

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(SAFAEIA; SOLOMON, 2007;BOSCH et al., 2013).

Várias cidades do Brasil já apresentam resultados bem promissores demonstrando que houveram mudanças positivas, algumas delas como Curitiba-PR e Campinas-SP, que aumentaram seus diagnósticos em NIC III e CC estágio I, como resultado do forte compromisso de controlar esse câncer, através de programas de saúde como observado no sistema de saúde dessas regiões(TEIXEIRA et al., 2018). Também a incidência e mortalidade em várias cidades caminham para diminuição devido programas continuados de atenção a saúde da mulher como demonstrado na FIGURA 1(INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2012).

FIGURA 1- INCIDÊNCIA E MORTALIDADE DE CÂNCER EM ALGUMAS CIDADES BRASILEIRAS



FONTE: INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (2012). Adaptado pelo autor (2019).

#### 4.1.3 Importância da histopatologia e classificação citológica

A citologia oncológica 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 (KITCHENER; CASTLE; COX, 2006; SAFAEIAN; SOLOMON, 2007; SAFAEIAN; SOLOMON, 2009; BOSCH et al, 2013). 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 (ZAHNISER; SULLIVAN, 1996).

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; SANKARANARAYANAN, 2003). As lesões NIC III devido à sua maior probabilidade de progressão para o câncer, se deixadas sem tratamento são consideradas seus reais precursores (MCCREDIE et al., 2008).

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 et al., 1998; ÖSTOR, 1993).

A infecção persistente, provocada por um ou mais dos tipos oncogênicos de 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; SANKARANARAYANAN, 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; QUINN; SANKARANARAYANAN, 2006; ZEFERINO et al., 2006; SAFAEIAN; SOLOMON, 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(DENNY; QUINN; SANKARANARAYANAN, 2006; ZEFERINO et al., 2006).

#### 4.1.4 Fatores de risco

O principal fator de risco para o câncer de colo uterino seria a infecção do vírus HPV(DOORSLAER; BURK, 2010; HO et al.,1998). Outros cofatores também são considerados para o câncer entre as mulheres infectadas por HPV, como o tabagismo, uso de anticoncepcionais hormonal (CO) a longo prazo, multiparidade e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)(BOSCH et al., 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; MUÑOZ, 2003).

As evidências parecem ser mais consistentes 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; MUÑOZ, 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(WOODMAN et al., 2001; SAFAEIAN ,SOLOMON, 2007; JENSEN et al., 2012).

#### 4.2 PAPILOMAVIRUS HUMANO

O HPV está associado a uma variedade de condições clínicas que se apresentam 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 reconhecido pela primeira vez como a causa das 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, 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 espontaneamente(VILLIERS,1989; BURD, 2003). A papilomatose respiratória recorrente é uma doença essencialmente da laringe em crianças com idade média de 3 anos, mas também pode ocorrer em adultos. Acredita-se que isso ocorra devido a um alto percentual de mães com 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; BURK, 2010). Há também alguma sugestão de que a doença pode ser adquirida intra-útero baseado em casos que foram documentados ao nascer depois da cesárea(BOSCH et al., 2013). A ligação

entre infecções genitais por HPV e câncer de colo, foi demonstrado pela primeira vez no início dos anos 80 por Harold Zur Hausen (1977), virologista alemão ganhador do prêmio Nobel de medicina de 2008 por seus trabalhos com HPV e CC. 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; DOORSLAER; BURK, 2010).

TABELA 1 - TIPO DE HPV E DOENÇA ASSOCIADA

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.

FONTE: BURD ( 2003). Adaptado pelo autor (2019)

A infecção pelo Papillomavirus humano (HPV) é uma condição necessária, mas não exclusiva para o desenvolvimento de CC(DOORSLAER; BURK, 2010; DOORBAR et al., 2012) .

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).

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. Na TABELA 1 vemos que 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; BURK, 2010). Os tipos oncogênicos prevalentes mundialmente são: 16, 18, 45, 31, 33, 58, 52 e 35(BOSCH et al., 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: (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: 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 et al., 2013; DOORBAR et al., 2012; STANLEY, 2012). Com aumento da evidência epidemiológica identificou-se que a infecção persistente, com oncogênicos  $\alpha$ -Papillomavirus humano como causadores de carcinoma cervical( SAFAEIAN; SOLOMON, 2007; ALVAREZ, et al., 2017).

#### 4.2.1 História natural e ciclo de vida do HPV

Aproximadamente 45% das mulheres vão adquirir uma infecção nos primeiros 36 meses de atividade sexual(HO et al., 1998). Em indivíduos saudáveis infecções por HPV regredem espontaneamente em 90 % dos casos dentro de 12-36 meses(WOODMAN et al., 2001;DOORSLAER; BURK, 2010) . 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, a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (HO et al., 1998; RODRÍGUEZ et al., 2010). Em mulheres de qualquer idade, infecções recentemente detectadas foram associadas com riscos absolutos muito baixos de persistência, NIC II, ou NIC III+(HO et al., 1998; RODRÍGUEZ et al., 2010). Para infecções recém-detectadas, a taxa de progressão para NIC II + (ou NIC III +), 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 diminuíram drasticamente com a idade(RODRÍGUEZ et al., 2010). 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 oncogênico até o câncer de colo, quando isso ocorrer, é de 25-30 anos ou mais (MCCREDIE et al., 2008; RODRÍGUEZ et al., 2010). Como vemos na TABELA 2, 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 elevada de progressão para câncer (DOORSLAER; BURK, 2010; SYRJÄNEN, 2017). Östör (1993) demonstrou que 5% dos NIC II e mais de 12% dos NIC III evoluíram para câncer, ao passo que apenas 1% das NIC I poderia ter a mesma evolução.

TABELA 2 - RESUMO DA HISTÓRIA NATURAL DA NIC

	Regressão	Persistência	Progressão para NIC III	Progressão para Invasão
NIC I	57%	32%	11%	1%
NIC II	43%	35%	22%	5%
NIC III	32%	<56%	-	>12%

FONTE: ÖSTOR (1993). Adaptado pelo autor (2019).

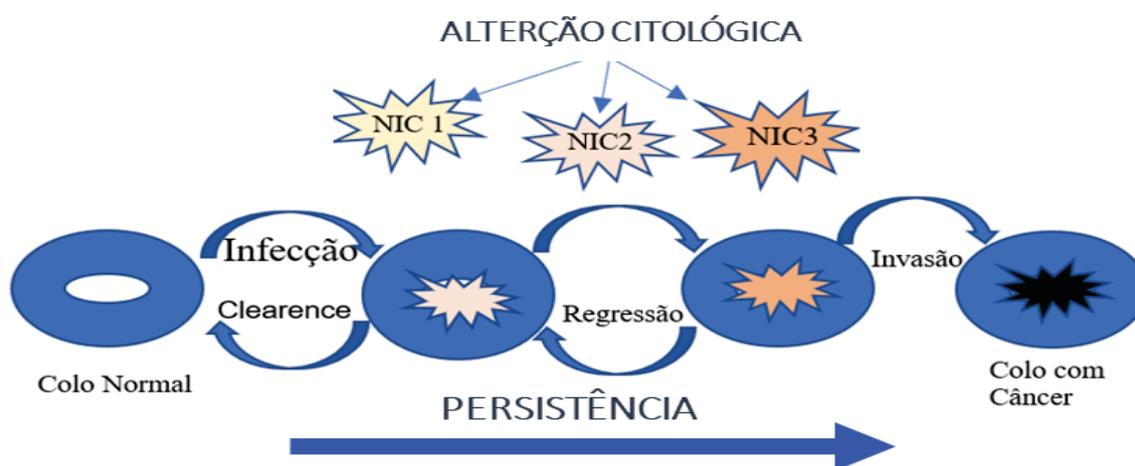
O NIC II pensava ser um passo intermediário de NIC I para NIC III (precursor direto do CC). Mais recentemente, a existência deste passo intermediário é questionada. Muitos estudos têm demonstrado que a interpretação da NIC II é bastante pobre (MCCREDIE et al., 2008; CASTLE et al., 2009), e do comportamento biológico é variável. Recentes dados mostraram que as taxas de regressão da NIC II entre as mulheres jovens (Definido como menos de 25 anos) chega até 75% (CASTLE et al., 2009; BOSCH et al., 2013). NIC III é um diagnóstico razoavelmente reprodutível e tem um risco de aproximadamente 30% de desenvolver em câncer ao longo de anos, se não tratada. NIC III é, portanto, um ponto de extremidade mais rigoroso para os ensaios clínicos, enquanto NIC II representa o limiar para o tratamento de proporcionar uma medida adicional de segurança (STOLER; SCHIFFMAN, 2001).

Na prática clínica diária, principalmente no Hospital Erasto Gaertner nos deparamos, com situações que fogem do habitual como é esperado e demonstrado na FIGURA 2, 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, essas observações são compartilhadas por varios autores(RODRÍGUEZ et al., 2010; STANLEY, 2012; BOSCH et al., 2013; SYRJÄNEN, 2017).

A infecção por HPV, está associada com um risco aumentado do desenvolvimento de câncer de colo 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 et al., 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 et al., 2013).

FIGURA 2- HISTÓRIA EVOLUTIVA DO CÂNCER DE COLO UTERINO



FONTE: O autor (2019).

Östor (1993) 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 (RODRIGUEZ et al., 2010) vão além e propõem a busca de biomarcadores que influenciem na persistência da infecção de HPV.

#### 4.2.2 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 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 (DELIGEOROGLOU et al., 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; MÜNGER, 2008).

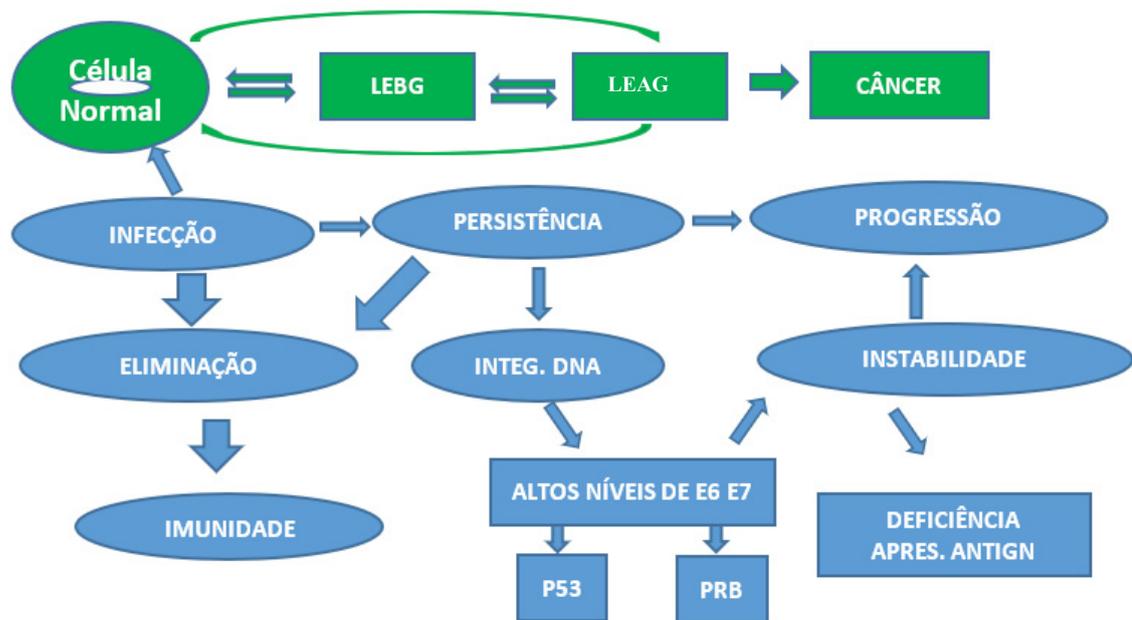
Genes iniciais são expressos nas camadas basal, supra basal, e as células intermediárias do colo do útero, ao passo que os genes de manifestação tardia, responsáveis pelas proteínas da cápside, são ativados nas camadas apicais. E1 prepara o genoma viral a ser replicado na célula hospedeira. E2 mantém a forma episomal 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; SPANAU; ROMAN, 2002).

Os genes E6 e E7 são as principais ferramentas oncogênicas no genoma viral. Em HPV baixo risco E6 e E7 aparecem inativos ou fracamente ativos. 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 (MÜNGER, 2002; BOSCH et al., 2013).

Os principais alvos celulares das oncoproteínas E6 e E7 do HPV, são o p53 e o pRb (proteína do retinoblastoma) que são supressores de tumorais, 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; MÜNGER, 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(KLINGELHUTZ; FOSTER; MCDOUGALL, 1996).

FIGURA 3 - MECANISMO DA CARCINOGENESE POR HPV



FONTE: adaptado de PRENDIVILLE; DAVIES (2004);

Nota: LEAG: lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (NIC II e NIC III); LEBG: lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (NIC I).

#### 4.2.3 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 HPVs oncogênicos, maior probabilidade de progressão para NIC III 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, 2010).

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 et al., 2012; BOSCH et al., 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-PINERES et al., 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 de colo(BOSCH et al., 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 armazenada em sequências de proteínas, mas também na estrutura da parte glicano de glicoconjugados(BUZÁS et al., 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, 2002). A resposta imune inata envolve ligação de moléculas do hospedeiro à superfície da membrana de 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(GARCÍA-PINERES et al., 2006; VASTA, 2009; DAM; BREWER, 2010).

#### 4.2.4 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, “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 está ativamente reprimida pelas proteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco(KANODIA, 2007). Existe também os TLRs que 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 et al., 2007). As proteínas E7 diminuem a eficácia dos TLR9(HASAN et al., 2007). Com isso tudo o HPV efetivamente escapa da resposta imune inata atrasando a ativação da imunidade adaptativa(STANLEY, 2010).

#### 4.2.5 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 efectoras citotóxicas. Esta mesma se apresenta irrelevante para a prevenção da infecção pelo HPV e doença por ele induzida(CARTER et al., 2000; STANLEY, 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 capsídeo 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 et al., 2000; STANLEY, 2010).

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 et al., 2007).

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 (PALEFSKY, 1995). 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 (KADISH, 2002; BURD, 2003). 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 de colo (um risco aumentado oito vezes em mulheres infectadas pelo HIV) e câncer anal (um risco aumentado 42 vezes em homens infectados pelo HIV) (CLIFFORD et al., 2005; RODEN; WU, 2006; PALEFSKY, 2009).

#### 4.2.6 Mecanismos de proteção induzida pela vacina

A hipótese atual é de que partículas semelhantes ao vírus HPV (VLP) induzam a produção de anticorpos. A imunização sistêmica com VLPs de L1 gera concentrações de anticorpos 1-4 vezes maior do que na infecção natural (HARPER et al., 2004). As VLPs encontram-se rapidamente as células dendríticas estromais, em meio inflamatório induzido por vacinação intramuscular, são fortemente ativados e migram 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 naïve no folículo que também resultará em imunidade. Na verdade, a VLP é intrinsecamente muito imunogênica por isso pode ativar os sensores imunes inatos, mesmo na ausência de adjuvante (HARRO et al., 2001; STANLEY, 2010).

Com o início da vacinação contra o HPV que está principalmente focado nos HPV's 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, et al., 2013).

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.

### 4.3 SISTEMA IMUNOLÓGICO

#### 4.3.1 Imunidade inata

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, 2000; CRUVINEL et al., 2010).

As principais células efetoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células Natural Killer – NK. 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 microorganismos, 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 microorganismos, 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), CRUVINEL et al. (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(JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

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(JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). Outros receptores presentes em fagócitos, com importante papel na resposta imune, são aqueles para frações do complemento, citocinas, interleucinas e imunoglobulinas(ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2003; CRUVINEI et al., 2010).

#### 4.3.2 Imunidade adaptativa

Em contraposição à resposta inata, a resposta imune adaptativa depende da ativação de células especializadas, os linfócitos, e das moléculas solúveis por eles produzidas (TABELA 3). 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)(DELVES; ROITT, 2000;ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2003; CRUVINEI et al., 2010).

TABELA 3 - CÉLULAS E MOLÉCULAS SOLÚVEIS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO

<b>Componente</b>	<b>Imunidade inata</b>	<b>Imunidade adquirida</b>
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

FONTE: CRUVINEL et al., (2010). Adaptado pelo autor (2019).

#### 4.3.3 Sistema complemento

O sistema do complemento é uma parte integrante do sistema imunológico inato formado por mais de 40 proteínas, sintetizadas no fígado, e liberadas no sangue para interagir com os leucócitos. São basicamente como enzimas inativas e sua ativação desencadeia uma cascata proteolítica, levando a 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; PORTINHO, 2001). O Complemento pode ser ativado através das vias alternativa, clássica, e a via das lectinas (RICKLIN et al., 2010; KJAER; THIEL; ANDERSEN, 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. (DEGN et al., 2009; THIEL et al., 2012).

##### 4.3.3.1 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; PORTINHO, 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. 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 (CRUVINEL et al., 2010). 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 a ela (LIM, 1990; ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

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, 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, o domínio C2a se liga ao complexo. (LIM, 1990). Após formação do complexo C4bC2a, a proteína C3 é ativada e também se conecta 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 formam uma enzima chamada C3Convertase, que cliva a C3 em C3a e C3b ela (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001; RICKLIN et al., 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; KIPNIS, 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, 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; KIPNIS, 1984; WARD; GUO; RIEDEMANN, 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" a 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 et al., 2008; HÄNSCH et al., 1988; YAMAMOTO, 1983). O CLM insere-se na membrana alvo, das células gram negativas, 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(WARD; GUO; RIEDEMANN, 2012).

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 et al., 2010).

#### 4.3.3.2 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; TILL, 1988). O fator D é uma Alfa globulina termo lábil, de p.m. de 25 kD, que consiste de uma cadeia polipeptídica única (ROTHER; TILL, 1988), uma enzima que existe no organismo na forma ativada (WILLIAMS; BURKS; STEELE, 1988), e que cliva o fator B, formando Bb. A properdina, uma gamaglobulina tetramérica com p.m. de 220 kD, é uma das proteínas reguladoras da via alternativa do complemento, sendo sua principal função estabilizar a convertase de C3 e C5, (LAW, 1988; ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

Quando não há imunoglobulinas, o sistema complemento pode ser ativado 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, 1989). Durante uma resposta inflamatória, estes fatores atraem as proteínas do sistema complemento que saem dos vasos sanguíneos por meio de estímulo causado pela liberação de histamina, leucotrienos e prostaglandinas pelos mastócitos, que deixam esses vasos espessos e permeáveis. Quando isso acontece, a proteína C3 se conecta a 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; BURKS; STEELE, 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 e 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. Este é o Evento Terminal Comum, pois é o mesmo para as duas vias do sistema complemento C5. ; (LAW, 1988; WILLIAMS; BURKS; STEELE, 1988; ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

#### 4.3.3.3 Via das lectinas

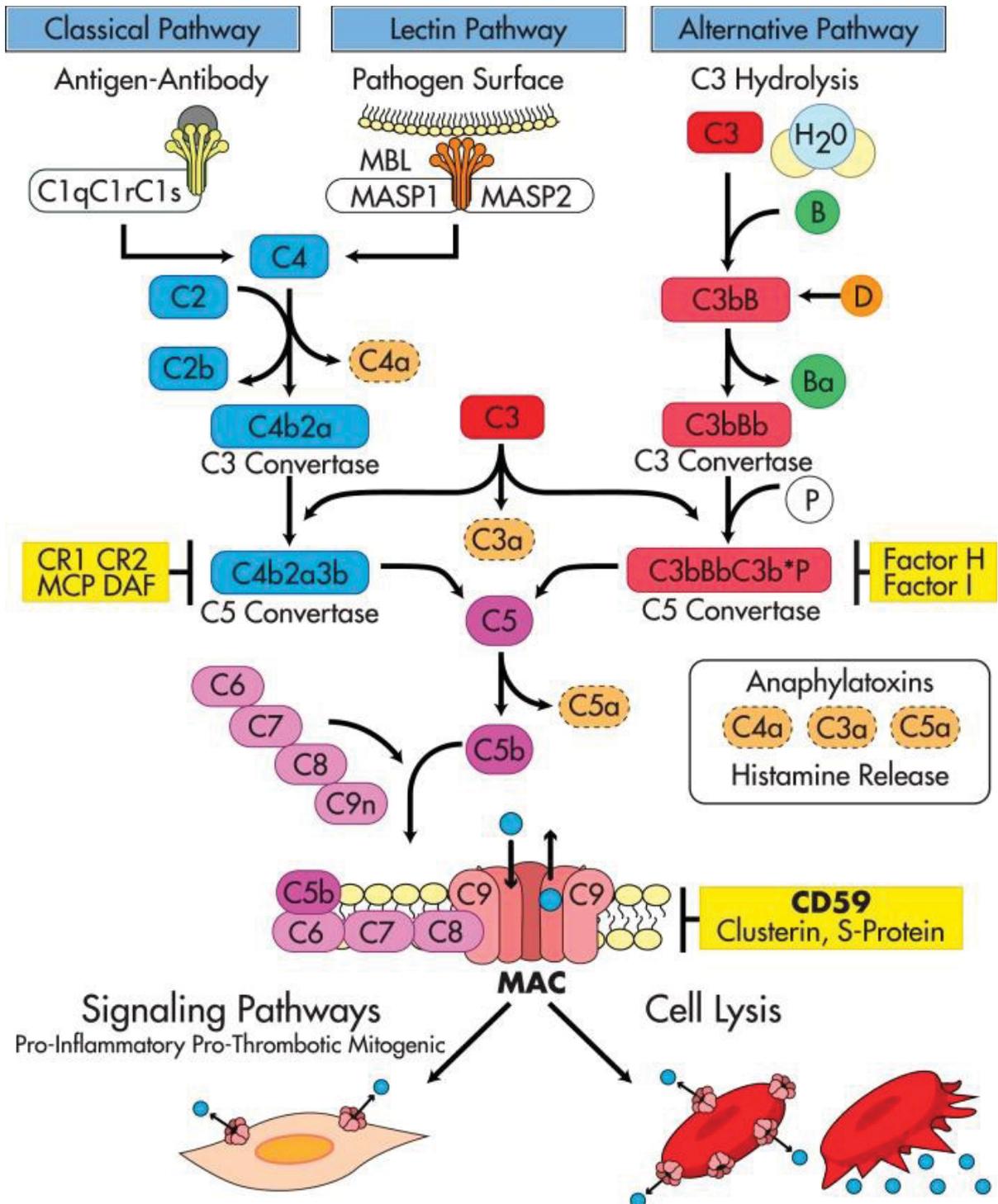
A ativação da via da lectina é iniciada em superfícies que exibem vários arranjos de carboidratos ou grupos acetila, que podem ser reconhecidos por pelo menos, cinco diferentes Moléculas de Reconhecimento de Padrões (PRMs): lectina ligante de manose (MBL), H-ficolina (ficolina 3), L-ficolina (ficolina-2), M-ficolina (ficolina-1) e CL-LK (heterocomplexo de colectina hepática 1 e colectina renal 1). O reconhecimento de padrões perigosos é transformado em sinais enzimáticos por duas serinas proteases (SP) ligadas com os PRMs, os SP 1 e 2 associados a MBL (MASP-1, MASP-2). O primeiro passo proteolítico é a auto-ativação do MASP-1, que então ativa o MASP-2. Ambas as enzimas podem clivar C2, no entanto C4 é clivado apenas pelo MASP-2. Como consequência, tanto o MASP-1 quanto o MASP-2 desempenham papéis essenciais na formação do complexo enzimático C4bC2a (OROSZLÁN et al., 2017). Além da MASP-1 e MASP-2 participam destas reações a MASP-3 e duas proteínas associadas a MBL a MAp19 (também conhecido como SMAP) e MAp44 (também chamado MAP - 1). (RICKLIN et al., 2010; KJAER et al., 2013;).

Na via da lectina, a MBL e as ficolinas agem como moléculas de reconhecimento, e serinas proteases associadas a MBL (MASP) são enzimas-chave para desencadear a cascata imunológica; A MASP- 2 é responsável pela ativação da via da lectina. A função de outras serina-proteases (MASP - 1 e MASP - 3) não são totalmente reconhecidas(BANDA et al., 2010). Estudos sugerem que MASP-1 desempenha um papel fundamental na ativação da via das lectinas, provavelmente através da ativação de MASP-2(TAKAHASHI et al., 2008).

A via das Lectinas (VL) atua como reconhecidora de padrões de hidratos de carbono. As serinas protease associadas 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; GUO; RIEDEMANN, 2012).

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(DOBO et al., 2009 ; RICKLIN et al., 2010).

FIGURA 4 - ESQUEMA RESUMIDO DA ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO



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.

FONTE: NAUTA (2003); KJAERA et al., (2013). Adaptado por GHOSH et al. (2015).

#### 4.4 MBL

A lectina ligante de manose (MBL) é uma glicoproteína de plasma que é sintetizada principalmente no fígado (TURNER, 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 no apoptose (TURNER, 2003; FREDERIKSEN et al., 2006; TAKAHASHI et al., 2008;; YTTING et al., 2007). 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 et al., 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 et al., 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, 2003; ZHANG et al., 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 potencial uso dessas moléculas como biomarcadores clínicos (IP et al., 2004; YTTING et al., 2007). Os níveis séricos e plasmáticos são apenas marginalmente diferentes, 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. Um elevado nível de MBL em geral tem sido observado 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 et al., 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. (KILPATRICK, 2002; SEGAT et al., 2009). 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, 2003; BUZÁS et al.; 2006; DAM; BREWER, 2010).

#### 4.4.1 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, visto que não houve correlação entre as mulheres que desenvolveram CC. Com isso sugere 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 et al. 2009). Também observado de forma semelhante por Guimarães que os polimorfismos podem interferir com qualquer tipo de HPV de alto, e de baixo risco durante a primeira fase da infecção(GUIMARAES et al., 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 et al., 2012).

#### 4.4.2 MASPS

O funcionamento em cascata da via da Lectina depende da MBL mas também de outras substâncias. Quando o sistema complemento é ativado, ocorre uma cascata de reações enzimáticas, levando a processos antimicrobianos, e também pode levar à liberação de várias reações inflamatórias potentes, resultando em danos ao próprio tecido do hospedeiro. Diferentes vias levam ao início do sistema do complemento; o clássico, a alternativa e as vias de lectina agindo muitas vezes de forma redundante para se conseguir o mesmo objetivo. A via da lectina pode ser iniciada quando qualquer uma das moléculas de reconhecimento lectina se liga a MANOSE como MBL, H-ficolina, L-ficolina M-ficolina ou colectina-K110 se ligam a um padrão de adaptação, que seria uma estrutura molecular reconhecível como sendo alvo de necessária eliminação, podendo estar em microrganismos ou células hospedeiras apoptóticas. Todas as cinco moléculas de reconhecimento estão relacionadas com as chamadas serina proteases associadas a MBL (MASPs); MASP-1, MASP-2 e MASP-3. Duas outras proteínas, MAp44 e MAp19, também são encontradas relacionadas com essas moléculas de reconhecimento. Esses componentes da via da lectina foram revisados recentemente por (DEGN et al., 2013) MASP-1, MASP-3 e MAp44 surgem do gene MASP1 por splicing mutuamente exclusivo, que é um mecanismo de replicação de RNA que promove uma variedade de proteínas a partir de um RNA produzido por um único gene, porém pode ser recortado e emendado de várias formas produzindo moléculas diferentes. De um modo semelhante, MASP-2 e MAp19 surgem do gene MASP2(SMEDBRÅTEN et al., 2016).

A MASP-1 tem especificidade de substrato relativamente ampla Jenny et al. (2015) ,como resultado está envolvida na coagulação (DOBÓ et al., 2009) e certas reações pró-inflamatórias, por exemplo, clivagem e ativação de receptores nas células endoteliais e clivagem de quininogênio de alto peso molecular produzindo a bradicinina pró-inflamatória(OROSZLÁN, et al., 2017). A terceira serina protease da via da lectina a MASP-3, juntamente com MAp19 e MAp44 foram inicialmente considerados simplesmente como reguladores negativos da via de lectina, mas resultados recentes implicaram que o MASP-3 tem um papel importante na ativação do sistema complemento em conexão com o caminho alternativo(IWAKI, et al. (2011).

O MASP-2 é uma molécula-chave que se liga à MBL e às ficolinas e fornece ativação da via da lectina. (DEGN et al., 2013). **Vários estudos anteriores**

**mostraram que a ativação excessiva da via da lectina pode ter um impacto adverso e a inibição do MASP-2 pode ter um efeito benéfico**(SCHWAEBLE et al., 2011; HOLMBERG et al., 2012). Estudos de modelos murinos por Schwaeble et al. (2011) e Asgari et al. (2014) demonstraram um papel protetor da deficiência de MASP-2 na lesão de reperfusão de isquemia miocárdica, gastrointestinal e renal.

Outro dado importante seria sobre a variação das concentrações destas substâncias. Seraina et al. (2011) observaram que houve apenas uma mudança insignificante nas concentrações destas proteínas com a idade, o que está de acordo com o que foi descrito anteriormente para algumas das proteínas; isto é, as mudanças mais pronunciadas nas concentrações ocorrem durante o primeiro ano de vida.

As MBL e as ficolinas ligam-se especificamente a superfícies patogénicas (vírus, fungos e bactérias) ou a estruturas alteradas do hospedeiro por reação isquêmica, tumoral, cancerosa, apoptótica, etc. Através de estruturas alvo que formam padrões de ligações e ajustam-se à geometria dos domínios de reconhecimento das moléculas (PRM)(FRAUENKNECHT et al., 2013; KJAER et al., 2013; SAEED et al. 2013). Após a ligação, as mudanças conformacionais levam à autoativação das serinas proteases conhecidas como MASPs. O MASP-1 ativado clivará o MASP-2, que posteriormente clivará os fatores de complemento C4 e C2, levando à formação de novas atividades enzimáticas, ou seja, formando convertases C3 e posteriormente convertases C5(KJAER et al., 2013; HÉJA et al. ,2012; FRAUENKNECHT et al., 2013). Além dessa atividade, o MASP-1 também parece ser uma proteína multifuncional com papéis na coagulação do sangue(FRAUENKNECHT et al., 2013). O MASP-3 tem uma função no desenvolvimento embrionário, pois mutações nas partes específicas do MASP-3 do gene MASP1 (que codificam MASP-1, MASP-3 e MAp44) estão associadas a síndromes de malformação humana(SIRMACI et al., 2010; ROORYCK et al., 2011). Porém ainda o papel fisiológico do MASP-3 não é bem compreendido tendo tanto um papel inibitório na via da lectina como um efeito acelerador na ativação da via alternativa(IWAKI et al., 2011). O MAp44 (também conhecido como MAP-1), juntamente com MASP-1 e MASP-3, é um dos três produtos alternativos de splicing do gene MASP1. O MAp44 compartilha os primeiros quatro domínios com MASP-1 e MASP-3. A função de MAp44 é a regulação da via da lectina, competindo com as MASPs pela ligação a MBL e ficolinas, resultando na inibição da ativação do complemento(DEGN et al., 2009; 2010).

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Erasto Gaertner (HEG) envolvendo, onde as pacientes eram 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. Nós avaliamos 470 pacientes não grávidas, atendidas no HEG, foram divididas em 4 grupos, NIC I, NIC II, NIC III, e Câncer de colo uterino, todas submetidas a biópsia de colo uterino e/ou conização, e/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 NIC I=54, NIC II=72, NIC III=145 e Câncer de colo uterino = 93. Das 17 hiv+ que foram excluídas, 9 eram NIC III, 5 eram NIC II, 1 NIC I e 1 Câncer,

Os critérios de inclusão foram mulheres, com lesão precursora ou câncer de colo uterino com diagnóstico por biópsia ou conização, sendo critério de exclusão pacientes com doença autoimune, infecção de qualquer tipo no momento da inclusão, hiv+ ou resultado da biópsia negativa para lesão de colo uterino. Foram divididas em 4 grupos sendo NIC I 54 casos, NIC II 72 casos, NIC III 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 com rotina e teste de HIV e parte deste sangue era reservado para posterior dosagem de MBL e serino proteases.

## 5.2 MÉTODOS

Todas as pacientes eram submetidas a coleta de amostras de sangue pré-operatório com hemograma, glicemia, creatinina e HIV como rotina do serviço.

As concentrações séricas de MBL e MASPs, foram dosadas nas pacientes, como descrito abaixo em detalhes. As pacientes não foram testadas para tipagem e presença de HPV. Estas pacientes foram seguidas por um mínimo de 4 anos, para se ter avaliação de sua evolução e comparar com as concentrações coletadas no início da pesquisa. Foram considerados com boa evolução as pacientes que não apresentaram recidiva, piora da lesão ou óbito.

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 imunofluorimetria a tempo resolvido (TRIFMA), que foi previamente descrito em detalhe (FREDERIKSEN et al., 2006). Após resfriamento à -96°C, foram acondicionadas e transportadas por via aérea por membro de nosso grupo de pesquisadores. 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” (10mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 15 mM NaN<sub>3</sub>, 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 CaCl<sub>2</sub>, 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 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  $\text{Eu}^{3+}$  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 nas proteínas, formando uma ligação covalente tioureia estável. Diluições de plasma padrão (3,6  $\mu\text{g}$  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.

### 5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o programa GRAPHPAD PRISM 6.0 de análise estatística, a significância foi avaliada, utilizando os testes de Qui-quadrado( $X^2$ ), curva ROC, Mann-Whitney, Kruskal Wallis por se tratar de amostra, não paramétrica. A significância da associação de risco foi avaliada com 5% como o valor de p crítico para as variáveis.

## Mannose-Binding Lectin Does Not Act as a Biomarker for the Progression of Preinvasive Lesions of Invasive Cervical Cancer

Carlos Afonso Maestri<sup>a</sup> Renato Nishihara<sup>c</sup> Guilherme P. Ramos<sup>b</sup>  
Hellen Weinschutz Mendes<sup>c</sup> Iara Messias-Reason<sup>c</sup>  
Newton Sérgio de Carvalho<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Liga Paranaense de Combate ao Câncer, Erasto Gaertner Hospital, and <sup>b</sup>Department of Gynecology and  
<sup>c</sup>Immunopathology Laboratory, Clinical Hospital, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil

### Significance of the Study

- In this study, mannose-binding lectin (MBL) serum concentrations were not associated with either human papillomavirus infection or cervical carcinogenesis. Hence, the use of MBL serum concentration as a biomarker for the progression of preinvasive cervical lesions into invasive cancer is not recommended.

### Keywords

Complement · Human papillomavirus · Cervical intraepithelial neoplasia · Cervical cancer

### Abstract

**Objective:** To evaluate serum concentrations of mannose-binding lectin (MBL) in women presenting with different human papillomavirus (HPV)-associated cervical lesions. **Subjects and Methods:** A total of 364 women, who underwent screening for cervical cancer or treatment at the Erasto Gaertner Cancer Hospital (HEG), Curitiba, Brazil, were enrolled in the study. Based on the latest cervical colposcopy-guided biopsy results, the women were divided into 4 groups: cervical intraepithelial neoplasia CIN-I ( $n = 54$ ), CIN-II ( $n = 72$ ), CIN-III ( $n = 145$ ), and invasive cancer ( $n = 93$ ). A time-resolved immunofluorometric assay was used to measure

the MBL concentrations in serum. The statistical analysis was done using GraphPad Prism 6.0. Comparisons were performed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests and analyzed by  $\chi^2$  test; continuous variables are presented as medians and categorical variables as frequencies. **Results:** The median MBL concentrations in decreasing order were as follows: invasive cancer: 1,452 ng/mL, CIN-I: 1,324 ng/mL, CIN-II: 1,104 ng/mL, and CIN-III: 1,098 ng/mL. However, no statistical significance was found among the 4 groups with HPV-associated lesions ( $p = 0.11$ ). Equally, the MBL levels did not show a significant association between the age of the patients and the severity of the cervical lesions ( $p = 0.68$ ). No statistical significance was found in the median values of MBL or in the status of MBL deficient ( $<100$  ng/mL) and high producers ( $>1,000$  ng/mL) among the women in each group ( $p = 0.77$ ). **Conclusion:** In this study, there was no statistically significant difference in MBL serum levels among the

KARGER

E-Mail [karger@karger.com](mailto:karger@karger.com)  
[www.karger.com/mpp](http://www.karger.com/mpp)

© 2017 The Author(s)  
Published by S. Karger AG, Basel

Karger  
Open access

This is an Open Access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-4.0 International License (CC BY-NC) (<http://www.karger.com/Services/OpenAccessLicense>), applicable to the online version of the article only. Usage and distribution for commercial purposes requires written permission.

Dr. Renato Nishihara  
Immunopathology Laboratory, Clinical Hospital, Federal University of Parana  
R. Prof. Pedro Viriato Parigot de Souza, 5300  
Curitiba, PR 81280-330 (Brazil)  
E-Mail [renatonishihara@gmail.com](mailto:renatonishihara@gmail.com)

## 6 PRIMEIRO ARTIGO PUBLICADO:

### Mannose Binding Lectin is not acting as a biomarker for the progression of pre-invasive lesions of invasive cervical cancer

Carlos Afonso Maestri<sup>1</sup>; Renato Nisihara<sup>3</sup>; Guilherme P. Ramos<sup>2</sup>, Hellen Weinschutz Mendes<sup>3</sup> Iara Messias-Reason<sup>3</sup>, Newton Sérgio de Carvalho<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Liga Paranaense de Combate ao Câncer, Erasto Gaertner Hospital. <sup>2</sup> Department of Gynecology, Clinical Hospital, Federal University of Parana <sup>3</sup> Immunopathology Laboratory, Clinical Hospital, Federal University of Parana, Curitiba, Parana-Brazil.

**Key Words:** Complement, HPV, cervical intraepithelial neoplasia, Cervical Cancer.

**Running title:** MBL in HPV-associated cervical lesions

#### 4.4 Abstract

**Objective:** To evaluate serum concentrations of mannose-binding lectin (MBL) in women presenting with different human papillomavirus (HPV)-associated cervical lesions. **Subjects and Methods:** A total of 364 women, who underwent screening for cervical cancer or treatment at the Erasto Gaertner Cancer Hospital (HEG), Curitiba, Brazil, were enrolled in the study. Based on the latest cervical colposcopy-guided biopsy results, the women were divided into 4 groups: cervical intraepithelial neoplasia CIN I ( $n = 54$ ), CIN II ( $n = 72$ ), CIN III ( $n = 145$ ), and invasive cancer ( $n = 93$ ). A time-resolved immunofluorometric assay was used to measure the MBL concentrations in serum. The statistical analysis was done using GraphPad Prism 6.0. Comparisons were performed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests and analyzed by  $\chi^2$  test; continuous variables are presented as medians and categorical variables as frequencies. **Results:** The median MBL concentrations in decreasing order were as follows: invasive cancer: 1,452 ng/mL, CIN I: 1,324 ng/mL, CIN II: 1,104 ng/mL, and CIN III 1,098 ng/mL. However, no statistical significance was found among the 4 groups with HPV-associated lesions ( $p = 0.11$ ). Equally, the MBL levels did not show a significant association between the age of the patients and the severity of the cervical lesions ( $p = 0.68$ ). No statistical significance was found in the median values of MBL or in the status of MBL deficient (<100 ng/mL) and high producers (>1,000 ng/mL) among the women in each group ( $p = 0.77$ ). **Conclusion:** In this study, there was no statistically significant difference in

MBL serum levels among the groups with CIN. Hence MBL serum concentration appeared not to have influenced the progression of HPV-related preinvasive cervical lesions into invasive cancer.

#### **4.5 Significance of the Study**

In this study, mannose-binding lectin (MBL) serum concentrations were not associated with either human papillomavirus infection or cervical carcinogenesis. Hence, the use of MBL serum concentration as a biomarker for the progression of preinvasive cervical lesions into invasive cancer is not recommended.

#### **4.6 Introduction**

Despite decades of research and preventive effort, cervical cancer remains the second leading cause of cancer-related death in women worldwide, especially in developing countries [1,2,3]. The human papillomavirus (HPV) is considered necessary for the development of squamous cell carcinoma of the uterine cervix (SCC) [1]. In about 10% of women with persistent HPV infection, the development of SCC begins with a preinvasive lesion, known as cervical intraepithelial neoplasia (CIN) [3,4]. Based on their capacity to progress into invasive cancer, these preinvasive lesions are classified as follows: high percentage of regression (CIN I), uncertain behavior (CIN II), and high potential of progression to cancer (CIN III).

Cytological screening programs are aimed at detecting and treating these precursor lesions to prevent the onset of invasive cancer [2], but the progression of these preinvasive lesions, most notably high-grade lesions (CIN II and CIN III), into invasive SCC is still unpredictable [4]. The standard surgical treatments for patients with HPV-associated cervical lesions (especially CIN II and III) could damage the cervical stroma, leading to cervical stenosis or cervical incompetence [5,6]. Therefore, it is crucial to establish methods to identify the patients whose lesions will progress to invasive SCC. Hence, molecular biomarkers which would selectively identify high-risk patients [2,7] have become important tools in the study of cervical cancer.

Mannose-binding lectin (MBL) is used as part of the first line of defense against infection, being a pattern recognition receptor that plays a pivotal role in innate immunity by interacting with surface sugars of a wide variety of microorganisms. The MBL activates the lectin-complement pathway, promotes opsonophagocytosis, and

modulates inflammation [8]. Human MBL is encoded by the *MBL2* gene, which largely defines MBL serum concentrations because the MBL levels vary 10-fold among individuals with an identical MBL genotype [9,10,11]. Low levels of serum MBL have been reported to be related to vulnerability due to infections by a wide range of microorganisms including viruses [8,11]. Conversely, higher levels of MBL could enhance tissue destruction due to unwarranted activation of complement [8,12]. In a few studies, an association between HPV and MBL has been reported [13,14,15,16]. Two of these studies [14,15,16] showed that certain polymorphisms in the *MBL2* gene were associated with higher susceptibility to infection conferred by high-risk HPV genotypes, but another study [13] did not show any such association between *MBL2* polymorphisms and HPV infection.

Ramos et al. [17] have previously reported on MBL concentrations in women presenting with HPV-associated cervical lesions, but there was no statistically significant difference between the median serum MBL levels in HPV-infected women presenting with CIN III lesions and healthy controls. There are still no reports on MBL concentrations in women presenting with CIN I and II or invasive cervical cancer. Thus, the objective of the present study was to assess MBL concentrations in HPV-infected women presenting with different cervical lesions.

#### **4.7 Subjects and Methods**

The study was carried out at the Erasto Gaertner Cancer Hospital (HEG) in Curitiba, in the southern region of Brazil, a reference center for the treatment of gynecological malignancies. The Institutional Ethics Committee approved the study. Inclusion criteria were cervical cancer screening and treatment at HEG from January 2011 to March 2012. Exclusion criteria were pregnancy, HIV positive, systemic infection, autoimmune disease, and blood transfusion within the last 60 days. Written informed consent was obtained from the all patients.

A group of 364 women was selected for this study. Based on the latest cervical colposcopy-guided biopsy, the 364 women were divided into 4 groups: CIN I ( $n = 54$ ), CIN II ( $n = 72$ ), CIN III ( $n = 145$ ), and invasive cancer ( $n = 93$ ). The loop electrical excision procedure or cold knife cone excision was used to confirm the previous biopsy results. A 3-mL sample of venous blood was collected from each subject and

allowed to coagulate; it was then centrifuged and serum was separated, aliquoted (500  $\mu$ L), and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used to determine MBL concentrations.

#### 4.8 MBL Quantification

An in-house time-resolved immunofluorometric assay, as described by Frederiksen et al. [10], was used to determine the MBL concentration serum samples at Aarhus University, Aarhus, Denmark. Briefly, serum samples were thawed, diluted, and incubated in 1  $\mu$ g mannan-coated wells washed several times. The bound MBL was quantified using biotinylated anti-MBL, followed by europium-labeled streptavidin. An enhancement solution was also added, and the signals were measured by time-resolved fluorometry on a 1232 Delfia fluorometer (Perkin Elmer/Wallac). For each mannan-coated microtiter plate used, 3 standard samples of laboratory controls were added and all the samples and controls were measured in duplicate.

#### 4.9 Statistical Analysis

The statistical analysis was done using GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA, USA) software package. Comparisons were performed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests and analyzed by  $\chi^2$  test; continuous variables are presented as medians and categorical variables as frequencies (percentages). Statistical significance was accepted when  $p < 0.05$ .

#### 4.10 Results

The mean age of each of the 4 study groups, the corresponding MBL serum levels, and lesion severity are shown in Table 1. Based on the median MBL concentration levels, no statistical significance was found among the 4 groups with HPV-associated lesions ( $p = 0.11$ ). Equally, the MBL levels did not show a significant association between the age of the subjects and the severity of the disease ( $p = 0.68$ ).

Table 1

Patient profile and median values of mannose-binding lectin (MBL) serum concentrations among the 4 groups of human papillomavirus-associated cervical lesions

	CIN-I (n = 54)	CIN-II (n = 72)	CIN-III (n = 145)	SCC (n = 93)	<i>p</i> value
Age, years					-
Mean	30.7	34.4	34.2	48.6	
Range	15–61	16–73	19–68	21–78	
MBL, ng/mL					0.1133
Median	1,324	1,104	1,098	1,452	
Range	100–7,189	100–6,603	100–9,607	100–7,101	

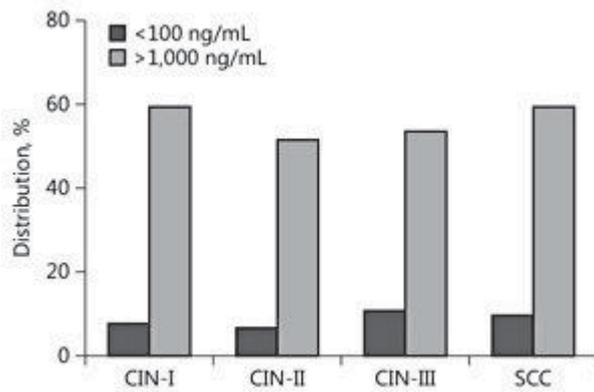
CIN-I, II, III, cervical intraepithelial neoplasia, grades 1, 2, and 3; SCC, squamous cell carcinoma of the uterine cervix (cervical cancer).

Of the 364 patients, 19 (5.2%) presented with MBL levels >5,000 ng/mL: CIN I: 4 (7.4%), CIN II: 2 (2.8%), CIN III: 3 (2.1%), and SCC: 10 (10.8%). Of the 10 SCC cases, 1 presented a microinvasive cervical cancer, 2 presented SCC stage I, and the other 7 were advanced SCC.

Based on the serum MBL levels, patients with MBL concentrations  $\leq 100$  ng/mL were considered MBL deficient and those with >1,000 ng/mL were considered high producers. The distribution of high and deficient producers among the 4 groups is described in Figure 1. No significant difference was found when comparing the 4 groups according to this distribution ( $p = 0.77$ ).

Fig. 1

Distribution of patients of the 4 study groups according to high (>1,000 ng/mL) and deficient producers (<100 ng/mL) of mannose-binding lectin.  $p = 0.774$  ( $\chi^2$  test). CIN I, II, III, cervical intraepithelial neoplasia, grades 1, 2, and 3; SCC, squamous cell carcinoma of the uterine cervix (cervical cancer).



#### 4.11 Discussion

In the present study, various MBL serum concentrations were not associated with the severity of cervical lesions. Therefore, it is probable that MBL serum concentration did not influence the progression of preinvasive cervical lesions into invasive cancer. The maintenance of stable HPV genomes in cells is the basis for viral deoxyribonucleic acid (DNA) persistence as the primary risk factor in cervical carcinogenesis [3,4]. As the complement system is part of the innate response, its activation produces inflammation, and it had been reported [3,4] that oncogenesis due to inflammation is associated with cancer development [3,4]. However, the mechanisms underlying the relationship between chronic inflammation and cancer still remain undefined.

The innate immune response components plays active roles in the progression of CIN into invasive SCC [7], and it has been shown that immunocompromised patients developed more severe HPV infections [18,19]. Furthermore, immunodepression has already been associated with increased recurrence of infections and higher viral load as well as the development of precancerous lesions [7,19].

Generally, low levels of MBL concentrations have been associated with vulnerability to bacterial, fungal, and viral infections [8,20,21]. Also, it has been suggested to be a potential factor favoring the development of cancer, such as pediatric or solid tumor

cancer [22]. Nevadunsky et al. [23] have demonstrated that MBL polymorphism was associated with reduced MBL protein concentrations in the vagina, and that this reduction may increase susceptibility to the development of ovarian cancer.

In this study, deficient and high MBL producers in each group of cervical lesions were indirectly identified by determining the MBL serum concentration. However, no statistically significant difference was found when stratifying the groups regarding MBL production, as previously reported [15,16]. Conversely, it has been reported that specific functional polymorphisms in the *MBL2* gene could increase women's susceptibility to infection by high-risk HPV genotypes due to low MBL serum levels [14,15,16]. In addition, Zupin et al. [24] suggested a possible association between *MBL2* polymorphisms responsible for low MBL production and susceptibility to the development of atypical squamous cells of undetermined significance.

The virus replicates within the cytoplasm of epithelial cells, preventing the activation of the immune response [25]. In addition, the viral cycle is noncytolytic and occurs only in cells already programmed to die during the epithelial maturation. There are also important viral proteins, E6 and E7, responsible for inactivating the interferon-dependent response, which is responsible for the host's viral protection [1,26]. Most importantly, the virus has very low serum circulating levels, avoiding contact with cells and circulating proteins of innate response [25,26]. Thus, the combination of these mechanisms, most notably the low MBL circulating levels, could explain why variations in the MBL serum concentration have a poor association with HPV infection and associated carcinogenesis.

The current data showed no statistically significant difference between median MBL serum levels of women presenting with CIN III cervical lesions compared to healthy controls, as previously reported on MBL serum concentrations in HPV-infected women [17].

The SCC group had the highest MBL median concentration and more cases >5,000 ng/ml. Plausible explanations for this finding could include an increase in MBL levels secondary to extensive tissue necrosis or metastatic disease leading to a systemic inflammatory process. As MBL is directly involved in the process of apoptosis, the extension of the cervical lesion necrosis itself could potentially interfere with the serum levels [27]. Ytting et al. [28] also reported that an increase in storing and

decreased metabolism could be responsible for the higher concentrations and that patients with cancer, most notably colorectal cancer, could present with higher MBL levels regardless of their *MBL2* genotype.

#### 4.12 Conclusion

This study did not show any statistically significant difference in the MBL median serum levels among the groups of patients with cervical lesions. Further studies are necessary to identify the role of the complement system in HPV-associated carcinogenesis.

#### 4.13 References

1. Bosch FX, Broker TR, Forman D, et al: Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine* 2013;31:H1-H31.
2. Arbyn M, Castellsagué X, de Sanjosé S, et al: Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol* 2011;22:2675-2686.
3. Van Doorslaer K, Burk RD: Evolution of human papillomavirus carcinogenicity. *Adv Virus Res* 2010;77:41-62.
4. Woodman CB, Collins S, Winter H, et al: Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal study. *Lancet* 2001;357:1831-1836.
5. Arbyn M, Kyrgiou M, Simoens C, et al: Peri-natal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a meta-analysis. *BMJ* 2008;337:a1284.
6. Kyrgiou M, Athanasiou A, Paraskevaidi M, et al: Adverse obstetric outcomes after local treatment for cervical preinvasive and early invasive disease according to cone depth: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2016;354:i3633.
7. Kadish AS, Timmins P, Wang Y, et al: 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 Prev* 2002;11:483-488.

8. Turner MW: The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* 2003;40:423-429.
9. Garred P, Larsen F, Madsen HO, et al: Mannose binding lectin deficiency. *Mol Immunol* 2003;40:73-84.
10. Frederiksen, PD, Thiel S, Jensen L, et al: Quantification of mannan-binding lectin. *J Immunol Methods* 2006;315:49-60.
11. Heitzeneder S, Seidel M, Förster-Waldl E, et al: Mannan-binding lectin deficiency - good news, bad news, doesn't matter? *Clin Immunol* 2012;143:22-38.
12. Schafranski MD, Stier A, Nisihara R, et al: Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: a beneficial role for MBL deficiency. *Clin Exp Immunol* 2004;13:521-525.
13. Parrella P, Seripa D, Matera MG, et al: Lack of association between genetic variants in the mannose-binding lectin 2 (MBL2) gene and HPV infection. *Eur J Epidemiol* 2007;22:159-162.
14. Guimaraes V, Guimaraes R, Brandao L, et al. Association between MBL2 gene functional polymorphisms and high-risk human papillomavirus infection in Brazilian women. *Hum Immunol* 2008;69:273-278.
15. Tsai CC, Lin TM, You HL, et al: Mannose-binding lectin in high-risk human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:618.e1-e6.
16. Segat I, Crovella S, Comar M, et al: MBL2 gene polymorphisms are correlated with high-risk human papillomavirus infection but not with human papillomavirus-related cervical cancer. *Hum Immunol* 2009;70:436-439.
17. Ramos GP, Nisihara R, Maestri CA, et al: MBL serum concentration in women with HPV presenting CIN III lesions. *Hum Immunol* 2013;74:67-69.
18. Clifford GM, Polesel J, Rickenbach M, et al: Cancer risk in the Swiss HIV Cohort Study: associations with immunodeficiency, smoking, and highly active antiretroviral therapy. *J Nat Cancer Inst* 2005;97:425-432.
19. Palefsky JM: Anal cancer prevention in HIV-positive men and women. *Curr Opin Oncol* 2009;21:433-438.

20. Donders GG, Babula O, Bellen G, et al: Mannose-binding lectin gene polymorphism and resistance to therapy in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. *BJOG* 2008;115:1225-1231.
21. Ip WK, To YF, Cheng SK, et al: Serum mannose-binding lectin levels and *MBL2* gene polymorphisms in different age and gender groups of southern Chinese adults. *Scand J Immunol* 2004;59:310-314.
22. Frakking FN, Brouwer N, Dolman KM, et al: Mannose-binding lectin (MBL) as prognostic factor in paediatric oncology patients. *Clin Exp Immunol* 2011;165:51-59.
23. Nevadunsky NS, Korneeva I, Caputo T, et al: Mannose-binding lectin codon 54 genetic polymorphism and vaginal protein levels in women with gynecologic malignancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;163:216-218.
24. Zupin L, Polesello V, Casalicchio G, et al: *MBL2* polymorphisms in women with atypical squamous cells of undetermined significance. *J Med Virol* 2015;18:851-859.
25. Stanley M: HPV - immune response to infection and vaccination. *Infect Agent Cancer* 2010;20:5-19.
26. Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, et al: Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:3822-3827.
27. Nauta AJ, Raaschou-Jensen N, Roos A, et al: Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol* 2003;33:2853-2863.
28. Ytting H, Christensen IJ, Steffensen R, et al: Mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease 2 (MASP-2) genotypes in colorectal cancer. *Scand J Immunol* 2011;73:122-127.



# MASP-1 and MASP-2 Serum Levels Are Associated With Worse Prognostic in Cervical Cancer Progression

Carlos Afonso Maestri<sup>1,2</sup>, Renato Nishihara<sup>2,3\*</sup>, Heïlen Weinschutz Mendes<sup>1</sup>, Jens Jensenius<sup>4</sup>, Stephen Thiel<sup>4</sup>, Iara Messias-Reason<sup>5</sup> and Newton Sérgio de Carvalho<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Liga Paranaense de Combate ao Câncer, Erasto Gaertner Hospital, Curitiba, Brazil, <sup>2</sup> Department of Medicine, Positivo University, Curitiba, Brazil, <sup>3</sup> Immunopathology Laboratory, Department of Clinical Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil, <sup>4</sup> Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark, <sup>5</sup> Department of Gynecology, Clinical Hospital, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Robert Braidwood Sim,  
University of Oxford, United Kingdom

### Reviewed by:

Dan Anthony Mitchell,  
University of Warwick,  
United Kingdom  
Krishnan Hajela,  
Devi Ahilya Vishwavidyalaya, India

### \*Correspondence:

Renato Nishihara  
renatonishihara@up.edu.br;  
renatonishihara@gmail.com

### Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular Innate Immunity,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 11 May 2018

Accepted: 07 November 2018

Published: 23 November 2018

### Citation:

Maestri CA, Nishihara R, Mendes HW,  
Jensenius J, Thiel S,  
Messias-Reason I and de Carvalho NS  
(2018) MASP-1 and MASP-2 Serum  
Levels Are Associated With Worse  
Prognostic in Cervical Cancer  
Progression. *Front. Immunol.* 9:2742.  
doi: 10.3389/fimmu.2018.02742

**Background:** MBL-associated serine proteases (MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAp-44, and MAp-19) are key factors in the activation of the lectin pathway of complement. Serum levels of these components have been associated with recurrence and poor survival of some types of cancer, such as colorectal and ovarian cancer. In this investigation, we determined the serum levels of MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAp-44, and MAp-19 in patients with cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia (CIN).

**Methods:** A total of 344 women who underwent screening for cervical cancer or treatment at the Erasto Gaertner Cancer Hospital in Curitiba-Brazil, were enrolled in the study. Based on their latest cervical colposcopy-guided biopsy results, they were divided into four groups: CIN-I:  $n = 52$ ; CIN-II:  $n = 73$ ; CIN-III:  $n = 141$ ; and invasive cancer:  $n = 78$ . All the serum protein levels were determined by time-resolved immunofluorometric assay (TRIFMA).

**Results:** Patients with invasive cancer presented significantly higher MASP-2, MASP-1, and MAp-19 serum levels than other groups ( $p < 0.0001$ ;  $p = 0.012$ ;  $p = 0.025$  respectively). No statistically significant differences in MASP-3 and MAp-44 serum levels were found between the four studied groups. In addition, high MASP-2, MASP-1, and MAp-19 serum levels were significantly associated with poor survival in patients with invasive cancer and relapse ( $p = 0.002$ ,  $p = 0.0035$  and  $p = 0.025$ , respectively).

**Conclusion:** High MASP-2, MASP-1, and MAp-19 serum levels were associated with cervical cancer progression and worse disease prognosis. These novel findings demonstrate the involvement of the serine proteases of the lectin pathway in the pathogenesis of cervical cancer and future investigations should clarify their role in the disease process.

**Keywords:** complement, lectin pathway, HPV, cervical intraepithelial neoplasia, cervical cancer

**7 Segundo artigo publicado:  
MASP-1 and MASP-2 Serum Levels Are Associated With Worse Prognostic in  
Cervical Cancer Progression**

PERSPECTIVE ARTICLE

Front. Immunol., 23 November 2018 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02742>

**MASP-1 and MASP-2 Serum Levels Are Associated With Worse Prognostic in  
Cervical Cancer Progression**

Carlos Afonso Maestri<sup>1,2</sup>; Renato Nisihara<sup>2,3\*</sup>; Hellen Weinschutz Mendes<sup>3</sup>, Jens Jensenius<sup>4</sup>, Stephen Thiel<sup>4</sup>, Iara Messias-Reason<sup>3</sup> and Newton Sérgio de Carvalho<sup>5</sup>

- <sup>1</sup>Liga Paranaense de Combate ao Câncer, Erasto Gaertner Hospital, Curitiba, Brazil
- <sup>2</sup>Department of Medicine, Positivo University, Curitiba, Brazil
- <sup>3</sup>Immunopathology Laboratory, Department of Clinical Pathology, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil
- <sup>4</sup>Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark
- <sup>5</sup>Department of Gynecology, Clinical Hospital, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil.

**4.14 Abstract**

Background: MBL-associated serine proteases (MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAp-44, and MAp-19) are key factors in the activation of the lectin pathway of complement. Serum levels of these components have been associated with recurrence and poor survival of some types of cancer, such as colorectal and ovarian cancer. In this investigation, we determined the serum levels of MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAp-44, and MAp-19 in patients with cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia (CIN).

Methods: A total of 344 women who underwent screening for cervical cancer or treatment at the Erasto Gaertner Cancer Hospital in Curitiba-Brazil, were enrolled in the study. Based on their latest cervical colposcopy-guided biopsy results, they were divided into four groups: CIN I: n = 52; CIN II: n = 73; CIN III: n = 141; and invasive

cancer: n = 78. All the serum protein levels were determined by time-resolved immunofluorometric assay (TRIFMA).

Results: Patients with invasive cancer presented significantly higher MASP-2, MASP-1, and MAp-19 serum levels than other groups ( $p < 0.0001$ ;  $p = 0.012$ ;  $p = 0.025$  respectively). No statistically significant differences in MASP-3 and MAp-44 serum levels were found between the four studied groups. In addition, high MASP-2, MASP-1, and MAp-19 serum levels were significantly associated with poor survival in patients with invasive cancer and relapse ( $p = 0.002$ ,  $p = 0.0035$  and  $p = 0.025$ , respectively).

Conclusion: High MASP-2, MASP-1, and MAp-19 serum levels were associated with cervical cancer progression and worse disease prognosis. These novel findings demonstrate the involvement of the serine proteases of the lectin pathway in the pathogenesis of cervical cancer and future investigations should clarify their role in the disease process.

#### **4.15 Introduction**

Human papilloma virus (HPV) is amongst the most common worldwide viral infection transmitted sexually. And although most HPV infections generally clear up on its own, a small percentage of these infections caused by specific HPV types can persist and evolve to cancer. The highest prevalence rate of HPV is observed in women younger than 25 years and decreases at later ages, but in many populations, there is a secondary peak in peri-menopause (1, 2). Young infected patients can usually eliminate the virus without presenting clear clinical evidence, due to an effective cell-mediated immune response causing the lesions to regress. The inability to develop an effective immune response to clear or control infection results in persistent infection that, in the case of oncogenic HPVs, creates a greater likelihood of progression to high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2, CIN 3) and carcinoma. On the other hand, about 50% of HPV infections in women with normal cytology will resolve in less than 1 year, and approximately 90% of women with either normal cytology or CIN 1 diagnoses will ultimately resolve on their own (2).

It is known that HPV has a variety of strategies to evade the immune response, and when this occurs, HPV replication continues leading to persistent infection (1, 2).

Among the approaches used by HPV to evade the host immune response are suppression of important inflammatory/immunological pathways that enable virus

escaping from host immune surveillance (3). Due to suppression of some danger signals, HPV infection does not produce cytolysis, cytopathic cell death or interferon (IFN) release, leading to lower grade inflammation (1, 4, 5).

Chronic inflammation in the tumor microenvironment and evasion of the antitumor effector immune response are two of the hallmarks required for oncogenesis and cancer progression. The innate immune system not only plays a critical role in perpetuating these tumor-promoting hallmarks but also in developing antitumor adaptive immune responses (6). Thus, understanding the dual role of the innate system in cancer immunology is required for the design of combined immunotherapy strategies able to tackle established tumors (6). The lectin pathway of the complement system is part of innate response, being triggered when pattern recognition molecules (PRMs), including the two collectins [mannan-binding lectin (MBL) and collectin-LK] and three ficolins (ficolin-1,-2, and-3) initiate the complement activation upon binding to carbohydrates present on the surfaces of microbes or altered tissues. When this occurs, three MBL-associated proteases (MASP-1,-2, and-3) provide activation of the complement system, and two MBL-associated proteins (MAp44 and MAp19) serve as natural endogenous competitive inhibitors (7). The proteins MASP-1, MASP-3, and Map44 arise from the MASP1 gene by mutually exclusive splicing (8). In a similar mode, MASP-2 and MAp19 arise from the MASP2 gene (7). All these components are key factors in the activation of the lectin pathway of complement. Serum levels of these components were associated with recurrence and poor survival of some types of cancer such as colorectal or ovarian cancer (9, 10). Increased serum levels of MBL and MASP-2 were found in patients with colorectal cancer, which were not explained by genetic profiles (9, 10). So far, no study has addressed the serine proteases of the lectin pathway proteins in relation to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. Our research group had previously reported on the MBL concentrations in women presenting with HPV-associated cervical lesions, showing there was no statistically significant difference between the median serum MBL concentrations in women presenting with CIN 1, CIN 2, CIN 3 lesions or invasive cervical cancer (11).

The aim of the present study was to investigate whether MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAp-44, and MAp-19 serum levels are involved in the pathogenesis and progression of cervical intraepithelial neoplasia by measuring their concentrations in women

presenting moderate grade of cervical intraepithelial neoplasia and cervical invasive cancer.

#### **4.16 Subjects and Methods**

This cross-sectional study was carried out at the Erasto Gaertner Cancer Hospital (HEG) in Curitiba, southern Brazil, which is a reference center for the treatment of gynecological malignancies. The Institutional Ethics Committee approved the study. All subjects were followed at the out-patient clinic of the HEG and were consecutively included from January 2011 to March 2012. Inclusion criteria were cervical cancer screening and treatment at HEG. We also collected historical data on disease progression from patients' medical records. Exclusion criteria were pregnancy, HIV-positivity, systemic infection, autoimmune disease, and blood transfusion within the last 60 days. Written informed consent was obtained from all patients.

A group of 344 women was included in this study. Based on their latest cervical colposcopy-guided biopsy, the subjects were divided into four groups:

low grade CIN 1: n = 52 (control group); moderate CIN 2: n = 73; CIN 3: n = 141; and invasive cancer (Ca): n = 78. The loop electrical excision procedure or cold-knife cone excision was used to confirm the previous biopsy results. A 3-ml sample of venous blood was collected from each subject and allowed to coagulate. The coagulated blood was centrifuged, and the serum was separated, aliquoted (500  $\mu$ l), and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , until use for MASP-1, MASP-2, MASP-3, Map-44, and Map-19 concentration determinations.

The concentrations of MASP-1, MASP-2, MASP-3, Map-44, and Map-19 were measured in according to published previously (8, 12, 13). The assays used for protein determinations were monoclonal antibody-based time-resolved immunofluorometric assays (TRIFMAs) and were carried out in partnership with the Institute of Medical Microbiology and Immunology, University of Aarhus, Aarhus. The human MASP-1 assay was based on competition from MASP-1 in serum with the interaction between anti-MASP-1 antibody and a fragment of MASP-1 coated onto microtitre wells. In the case of MASP-2 concentration ("sandwich ELISA"), rat anti-MASP-2 mAb (clone 8B5) was used for coating while biotinylated rat anti-MASP-2/MAp19 mAb (clone 6G12). MASP-3, Map-44, and Map-19 was determined by sandwich ELISA using specific antibodies. All the assays used Eu<sup>3+</sup>-labeled

streptavidin (Perkin Elmer, USA)—for detection. All the antibodies were kindly provided by Prof. Jens C. Jensenius (Aarhus University, Denmark).

Data were analyzed as frequency and contingency tables. The Kolmogorov–Smirnov test was used to assess the data distribution. Central tendency was expressed as mean and standard deviation or median and interquartile range (IQR), and the Mann–Whitney test was used to compare numerical data. A receiver-operator characteristic curve (ROC) was also calculated for MASP-2. Results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . GraphPad Prism 7.0 software was used for statistical analysis.

#### 4.17 Results

The serum concentration of MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAp-44, and MAp-19 proteins in the investigated groups is presented in Table 1. Significantly higher MASP-2, MASP-1, and MAp-19 serum were observed in patients with invasive cancer compared to other groups ( $p < 0.025$ ). However, no significant differences were observed for MASP-3 and MAp-44 levels.

TABLE 1 (vide anexos)

**TABLE 1** | MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAp-44, and MAp-19 serum concentrations in patients with cervical lesions and cancer.

	<b>CIN-1</b> ( <i>n</i> = 52)	<b>CIN-2</b> ( <i>n</i> = 73)	<b>CIN-3</b> ( <i>n</i> = 141)	<b>Ca</b> ( <i>n</i> = 78)	<b><i>p</i></b>
MA SP-1 (ng/mL) median (IQR)	5,636 (3,758–8,129)	6,083 (3,823–8,422)	4,714 (3,319–6,839)	6,435 (3,971–9,074)	0.012
MA SP-2 (ng/mL) median (IQR)	232.2 (163–386)	264.5 (190–418)	282.5 (204–410)	354.4 (234–570)	0.001
MA SP-3 (ng/mL) median (IQR)	3,846 (2,750–5,212)	3,984 (3,181–5,180)	4,053 (2,947–5,071)	3,954 (2,705–5,142)	0.829
MAp-44 (ng/mL) median (IQR)	1,695 (1,343–2,248)	1,787 (1,471–2,271)	1,710 (1,434–2,099)	1,866 (1,598–2,171)	0.246
MAp-19 (ng/mL) median (IQR)	214.2 (152–289)	239.3 (162–318)	234.4 (167–298)	309.9 (219–467)	0.025

IQR, Interquartile range; CIN, Cervical intraepithelial neoplasia; Ca, Cancer.

Table 1. MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAp-44, and MAp-19 serum concentrations in patients with cervical lesions and cancer.

Regarding clinical evolution, 41 (11.9%; mean age 51.4 years) patients died within 24–48 months. Surviving patients had a mean age of 34.8 years. When serum concentrations were evaluated, median MASP-2 levels were higher among patients who died than among those who survived (439.4 ng/ml × 278.3 ng/mL;  $p < 0.0001$ ). For MASP-1 (6988 ng/mL vs. 5110 ng/mL;  $p=0.0035$ ) and MAp-19 (366 ng/mL vs.

234 ng/mL;  $p = 0.012$ ), the same trend was observed. Serum concentration of MASP-3 and MAp-44 were not significantly different between the two groups. When patients who died and those who experienced relapse of CIN or cancer during follow-up were considered, only MASP-2 and MAp-19 were significantly different (Table 2).

TABLE 2 (vide anexos)

Table 2. Association between MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAp-44, and MAp-19 serum concentrations and clinical evolution in patients with cervical lesions.

ROC curve was used to show the sensitivity and specificity for MASP-2 serum concentrations in relation to the prognosis of cervical cancer progression. High levels of MASP-2 ( $>291.9$  ng/mL) showed a sensitivity of 71.3 and a specificity of 63.2 for worse prognosis of cervical lesions.

**TABLE 2 |** Association between MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAp-44, and MAp-19 serum concentrations and clinical evolution in patients with cervical lesions.

	<b>Without death or relapse</b>	<b>With death or relapse</b>	<b>P*</b>
MASP-1 (ng/mL) median	5,144	6,206	0.069
MASP-2 (ng/mL) median	273.7	382.4	0.002
MASP-3 (ng/mL) median	3,960	3,846	0.58
Map-44 (ng/mL) median	1,739	1,814	0.76
Map-19 (ng/mL) median	239.7	299.5	0.025

\*Mann–Whitney test.

#### 4.18 Discussion

Our study demonstrates that MASP-2, MASP-1, and MAp-19 could have a role in the progression of cervical cancer. Patients diagnosed with invasive cancer showed a significant increase in the concentrations of these lectin pathway components. In another study conducted by our group, we failed to establish the relationship between serum concentration of MBL and the evolution of cervical intraepithelial neoplasias (10). These novel findings indicate possible involvement of the lectin pathway in the immunopathogenesis of cervical cancer, although it can result, in part, from activation of the complement system due to the presence of tumor cells. In fact, the participatory role of lectin pathway components in defense against pathogens such as viruses, bacteria, or fungi is much better known and studied: MASPs

deficiencies are associated with increased infection susceptibility, and increased levels are associated with tissue injury (14). However, studies about its role in the development of cancer are scarce.

In a study of colorectal cancer, Ytting et al. (10) observed higher MASP-2 serum concentrations in patients with cancer, although no differences for MASP2 genotypes were detected between patients with colorectal cancer and healthy controls.

Furthermore, serum levels of MASP-2 have been associated with post-operative infections, recurrent cancer, and poor survival in colorectal cancer patients (9). These findings suggest that increased MASP-2 serum concentrations may occur due to factors other than genetics and that MASP-2 may play a role in cancer development and disease outcome. Corroborating these observations, in our study high MASP-2 serum concentrations were related to worse prognosis in cervical cancer and interestingly, they were mainly altered in patients who died and/or had disease recurrence. MASP-2 is produced in hepatocytes, and its promoter is regulated by cytokines such as interleukin (IL)-1b and IL-6 or transcription factor STAT3 (15). It is possible that tumor tissue releases mediators that may increase serum levels of MASP-2, however this is a hypothesis that needs to be clarified. Studying genetic polymorphism and MASP-2 serum levels in patients with ovarian cancer, Swierzko et al. (9) concluded that the expression of MBL and MASP-2 is altered in ovarian cancer, possibly indicating involvement of the lectin pathway of complement in the disease. Similar results of increased MASP-2 serum levels were described in children with tumors of the central nervous system (16) and in patients with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma (16).

In our study, MASP-1 serum concentrations were significantly higher in cancer patients than in other studied groups. The normal MASP-1 concentration in serum/plasma is approximately 20-fold higher than that of MASP-2 (13). It is known that MASP-1 activates MASP-2 in heterocomplexes of large oligomeric MBL and produces 60% of the C2b responsible for C3 convertase formation (17). Additionally, MASP-1 was reported to be essential for the development of autoimmune-associated inflammatory tissue injury by activating the alternative complement pathway in an experimental model of inflammatory arthritis (18). There are no studies on MASP-1 concentrations in cancer.

Complement system and macrophages collaborate synergistically to maintain progression of angiogenesis and create conditions of carcinogenesis such as

dysregulation of mitogenic signaling pathways, cellular proliferation, angiogenesis, resistance to apoptosis, and escape from immuno-surveillance. Macrophages release mediators that modulate inflammation and acquired immunity response. In addition, promote angiogenesis, tissue remodeling and tissue repair (19). The tumor growth is sustained by the infiltration of M2-tumor-associated macrophages, and high levels of C3a and C5a. Macrophages have receptors for both C3a and C5a on their cell surface, and this specific binding affects the functional modulation and angiogenic properties (19). High levels of MASP-2 and MASP-1 may increase activation of the complement system by the lectin pathway, thereby augmenting the release of C5a, a potent anaphylatoxin that activates cellular responses involved in tumor growth and progression (20). During cervical lesion progression, the number of M2 macrophages is significantly increased. The aggregation of M2 is a key event in the pathological process of carcinogenesis (21). M2 macrophages increase vascular endothelial growth factor (VEGF) and metalloprotease-9 secretion to aid in tissue repair. On the other hand, complement system activation by tumors may result in basement membrane disruption, tumor growth, and metastasis (22). In vivo, HPV does not bind directly to cells but requires contact with the basement membrane. This contact can be accomplished by microabrasions on the cervical surface, which reveal the basement membrane. The most plausible receptor of the major capsid protein (L1) of HPV appears to be the tissue-specific heparin sulfate proteoglycan, which belongs to the basement membrane (23, 24). It is possible that patients with higher serum levels of MASP-1 and/or MASP-2 present exacerbate activation of complement leading to the disturbance of the basement membrane, and ultimately to its damage or rupture and consequently, tumor invasion.

Interestingly, HPV protein (E2, E6, E7) action on IL10 gene leads to increased IL-10 levels which in turn increases HPV E6 and E7 expression, leading to a vicious cycle (3, 22). IL-10 is an anti-inflammatory cytokine that modulates cytokine synthesis and exerts effects on resident and circulating immune cells, suppressing the immune system; however, their role in cancer remains controversial (3). On the other hand, activation of complement system is clearly an inflammatory process that acts to protect the host. However, to date, the majority of studies on cancer and the lectin pathway have shown a relation with worse prognosis when serum levels of components of this pathway were increased (9, 16). Future studies should

investigate how complement interacts with the basement membrane and tumor tissue along with the influence of cytokine network on this system.

The limitations of this study are due to its cross-sectional study design, which prevented the use of serial dosages of the lectin pathway components over time to evaluate the stability of component concentrations throughout disease progression. Thus, future investigations evaluating the role of the different components of the lectin pathway, including collectins, ficolins and MASPs in the evolution of cervical lesions should be encouraged. In addition, our study did not include a healthy control group, for obvious reason, since it would be very difficult to obtain a group of women without HPV infection, either for ethical reasons or lack of lab tests to prove this condition. Thus, we believe that CIN 1 was the appropriate comparison group for our study, especially considering that such patients show good immune response against HPV and generally (>90%) do not progress to cancer (2).

In conclusion, our study shows that high MASP-2, MASP-1, and MASP-19 serum levels are associated with cervical cancer progression and worse disease prognosis. Future investigations should clarify the role of these complement components in cervical cancer immunopathogenesis.

#### **4.19 Author Contributions**

CM and NdC: protocol and project development, data collection or management, and manuscript writing and editing; RN: protocol and project development, data analysis, and manuscript writing and editing; HM: protocol and project development, laboratorial assays, and manuscript writing and editing; JJ, ST, and IM-R: protocol and project development, and manuscript writing and editing.

#### **Conflict of Interest Statement**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## 4.20 References

1. Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine* (2013) 31 (Suppl. 7):H1–31. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.10.003  
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
2. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* (2012) 30 (Suppl. 5):F55–70. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.083  
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
3. Berti FCB, Pereira APL, Cebinelli GCM, Trugilo KP, Brajão de Oliveira K. The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. *Cytokine Growth Factor Rev.* (2017) 34:1–13. doi: 10.1016/j.cytogfr.2017.03.002  
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
4. Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev.* (2012). 25:215–22. doi: 10.1128/CMR.05028-11  
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
5. Bordignon V, Di Domenico EG, Trento E, D'Agosto G, Cavallo I, Pontone M, et al. How human papillomavirus replication and immune evasion strategies take advantage of the host DNA damage repair machinery. *Viruses* (2017) 9:390. doi: 10.3390/v9120390  
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
6. Berraondo P, Minute L, Ajona D, Corrales L, Melero I, Pio R. Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance. *Immunol Rev.*(2016) 274:290–306. doi: 10.1111/imr.12464  
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
7. Degn SE, Jensen L, Olszowski T, Jensenius JC, Thiel S. Co-complexes of MASP-1 and MASP-2 associated with the soluble pattern-recognition molecules drive lectin pathway activation in a manner inhibitable by MAp44. *J Immunol.* (2013) 191:1334–45. doi: 10.4049/jimmunol.1300780  
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
8. Degn SE, Jensen L, Gál P, Dobó J, Holmvad SH, Jensenius JC, et al. Biological variations of MASP-3 and MAp44, two splice products of the MASP1 gene involved

in regulation of the complement system. *J Immunol Methods* (2010) 361:37–50. doi: 10.1016/J.JIM.2010.07.006

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

9. Swierzko AS, Szala A, Sawicki S, Szemraj J, Sniadecki M, Sokolowska A, et al. Mannose-Binding Lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2) in women with malignant and benign ovarian tumours. *Cancer Immunol Immunother.* (2014) 63:1129–40. doi: 10.1007/s00262-014-1579-y

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

10. Ytting H, Christensen IJ, Steffensen R, Alsner J, Thiel S, Jensenius JC, et al. Mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease 2 (MASP-2) genotypes in colorectal cancer. *Scand J Immunol.* (2011) 73:122–7. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02480.

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

11. Maestri C, Nisihara R, Ramos G, Mendes H, Messias-Reason IJ, Carvalho N. Mannose binding lectin is not acting as a biomarker for the progression of pre-invasive lesions of invasive cervical cancer. *Med Princ Pract.* (2017) 330:530–4. doi: 10.1159/000485037

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

12. Møller-Kristensen M, Jensenius JC, Jensen L, Thielens N, Rossi V, Arlaud G, et al. Levels of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 in healthy individuals. *J Immunol Methods* (2003) 282:159–67. doi: 10.1016/j.jim.2003.08.012

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

13. Thiel S, Jensen L, Degn SE, Nielsen HJ, Gál P, Dobó J, et al. 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.* (2012) 169:38–48. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04584.

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

14. Beltrame MH, Boldt ABW, Catarino SJ, Mendes HC, Boschmann SE, Goeldner I, et al. MBL-associated serine proteases (MASPs) and infectious diseases. *Mol Immunol.* (2015) 67:85–100. doi: 10.1016/j.molimm.2015.03.245

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

15. Unterberger C, Hanson S, Klingenhoff A, Oesterle D, Frankenberger M, Endo Y, et al. Stat3 is involved in control of MASP2 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* (2007) 364:1022–5. doi: 10.1016/J.BBRC.2007.10.114  
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
16. Fisch UP, Zehnder A, Hirt A, Niggli F, Simon A, Ozsahin H, et al. Mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 in children with cancer. *Swiss Med Wkly.* (2011) 141: w1319. doi: 10.4414/smw.2011.13191  
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#)
17. Degn S, Jensen L, Hansen A, Duman D, Tekin M, Jensenius JC, et al. Mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway activation in human serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function. *J Immunol.* (2012) 189:3957–69. doi: 10.4049/jimmunol.1201736  
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
18. Banda NK, Takahashi M, Levitt B, Glogowska M, Nicholas J, Takahashi K, et al. Essential role of complement mannose-binding lectin-associated serine proteases-1/3 in the murine collagen antibody-induced model of inflammatory arthritis. *J Immunol.* (2010) 185:5598–606. doi: 10.4049/jimmunol.1001564  
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
19. Khan MA, Assiri AM, Broering DC. Complement and macrophage crosstalk during process of angiogenesis in tumor progression. *J Biomed Sci.*(2015) 22:58. doi: 10.1186/s12929-015-0151-1  
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
20. Markiewski MM, Deangelis RA, Benencia F, Ricklin-Lichtsteiner SK, Koutoulaki A, Gerard C, et al. Modulation of the anti-tumor immune response by complement. *Nat Immunol.* (2008) 9:1225–35. doi: 10.1038/ni.1655  
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
21. Song D, Li H, Li H, Dai J. Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer (Review). *Oncol Lett.* (2015) 10:600–6. doi: 10.3892/ol.2015.3295  
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
22. Deligeoroglou E, Giannouli A, Athanasopoulos N, Karountzos V, Vatopoulou A, Dimopoulos A, et al. HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. *Infect Dis Obstet Gynecol.* (2013) 2013:540850. doi: 10.1155/2013/540850

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

23. Schiller JT, Day PM, Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol.* (2010) 118 (Suppl. 1): S12–7. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.04.004

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

24. Joyce JG, Tung J-S, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem.* (1999) 274:5810–22. doi: 10.1074/JBC.274.9.5810

## 8 Ilustrações dos artigos publicados:

### Primeiro artigo - Mannose Binding Lectin is not acting as a biomarker for the progression of pre-invasive lesions of invasive cervical cancer

FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DOS 4 GRUPOS DE ESTUDO, DE ACORDO COM PRODUTORES ALTOS (> 1.000 NG / ML) E DEFICIENTES (<100 NG / ML) DE LECTINA LIGADA À MANOSE. P = 0,774 (T2 TESTE). NIC I, II, III NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL, GRAUS 1, 2 E 3; CARCINOMA INVASOR (SCC)

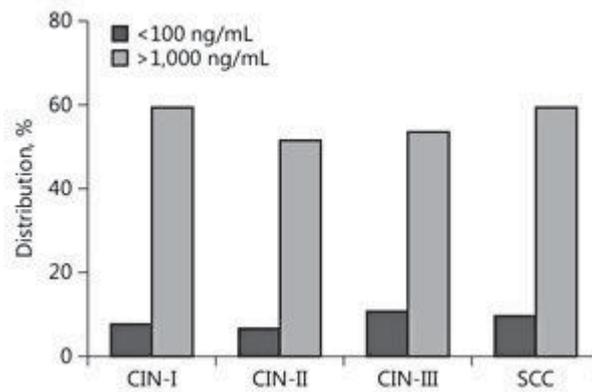


TABELA 4 – PERFIL DO PACIENTE E VALORES DA MEDIANA DE CONCENTRAÇÕES DE SÉRICA DE LECTINA DE LIGANTE DE MANOSE (MBL) ENTRE OS 4 GRUPOS DE LESÕES CERVICAIS ASSOCIADAS A VÍRUS DE PAPILOMA HUMANO

	CIN-I (n = 54)	CIN-II (n = 72)	CIN-III (n = 145)	SCC (n = 93)	p value
Age, years					-
Mean	30.7	34.4	34.2	48.6	
Range	15-61	16-73	19-68	21-78	
MBL, ng/mL					0.1133
Median	1,324	1,104	1,098	1,452	
Range	100-7,189	100-6,603	100-9,607	100-7,101	

CIN-I, II, III, cervical intraepithelial neoplasia, grades 1, 2, and 3; SCC, squamous cell carcinoma of the uterine cervix (cervical cancer).

**Segundo artigo publicado: MASP-1 and MASP-2 Serum Levels Are Associated With Worse Prognostic in Cervical Cancer Progression**

TABELA 5- CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAP-44 E MAP-19 EM PACIENTES COM LESÕES CERVICAIS E CÂNCER

	CIN 1 (n = 52)	CIN 2 (n = 73)	CIN 3 (n = 141)	Ca (n = 78)	p
<b>MASP-1</b>	5636	6083	4714	6435	0.012
<b>(ng/mL)</b>	(3758–8129)	(3823–8422)	(3319–6839)	(3971–9074)	
<b>mediana (IQR)</b>					
<b>MASP-2</b>	232.2	264.5	282.5	354.4	0.001
<b>(ng/mL)</b>	(163–386)	(190–418)	(204–410)	(234–570)	
<b>mediana (IQR)</b>					
<b>MASP-3</b>	3846	3984	4053	3954	0.829
<b>(ng/mL)</b>	(2750–5212)	(3181–5180)	(2947–5071)	(2705–5142)	
<b>mediana (IQR)</b>					
<b>Map-44</b>	1695	1787	1710	1866	0.246
<b>(ng/mL)</b>	(1343–2248)	(1471–2271)	(1434–2099)	(1598–2171)	
<b>mediana (IQR)</b>					
<b>Map-19</b>	214.2	239.3	234.4	309.9	0.025
<b>(ng/mL)</b>	(152-289)	(162-318)	(167-298)	(219-487)	
<b>mediana (IQR)</b>					

IQR: Interquartile range; CIN: Cervical intraepithelial neoplasia; Ca: Cancer

TABELA 6- ASSOCIAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAP-44 E MAP-19 E EVOLUÇÃO CLÍNICA EM PACIENTES COM LESÕES CERVICAIS

	Sem morte ou recidiva	Com morte ou recidiva	P*
MASP-1 (ng/mL)			
mediana	5144	6206	0.069
MASP-2 (ng/mL)			
mediana	273.7	382.4	<b>0.002</b>
MASP-3 (ng/mL)			
mediana	3960	3846	0.58
Map-44 (ng/mL)			
mediana	1739	1814	0.76
Map-19 (ng/mL)			
mediana	239.7	299.5	<b>0.025</b>

\* Mann–Whitney test

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. JANAWAY JR., C.A. Immunology : improving on nature in the twenty-first century of medicine. **Cell**, Cambridge, v. 100, p. 129-138, 2000.
- ABBAS AK, L. A. H.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 6th. ed. Philadelphia: Saunders, 2003.
- AKRUDDIN, J. et al. Chemokines, cytokines, and interleukine. **Blood**, New York, v. 109, p. 841-849, 2007.
- ALEXANDER, J. et al. The complement cascade: Yin-Yang in neuroinflammation , neuro–protection and –degeneration. **J. Neurochem.**, Oxford, v. 107, p. 169-187, 2008.
- ALVAREZ, K. L. F. et al. Local and systemic immunomodulatory mechanisms triggered by human papillomavirus transformed cells: a potential role for g-csf and neutrophils. **Sc. Rep.**, New York, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2017.
- ASGARI, E. et al. Mannan-binding lectin-associated serine protease 2 is critical for the development of renal ischemia reperfusion injury and mediates tissue injury in the absence of complement C4. **FASEB J.**, Bethesda, v. 28, n. 9, p. 3996-4003, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5184842/>>. Acesso em: 12 dez. 2018.
- BANDA, N. K. et al. Essential role of complement mannose-binding lectin-associated serine proteases-1/3 in the murine collagen antibody-induced model of inflammatory arthritis. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 185, n. 9, p. 5598-5606, 2010. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1001564>>. Acesso em: 12 dez. 2018.
- BERRAONDO, P. et al. Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance. **Immunol. Rev.**, Copenhagen, v. 274, n. 1, p. 290-306, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/imr.12464>>. Acesso em: 20 dez. 2018.
- BOSCH, F. X. et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. **Vaccine**, Kidlington, v. 31, Suppl 7, p. H1-H31, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.003>>. Acesso em: 11 dez. 2018.
- BOYER, S. N.; WAZER D. E.; BAND, V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitinproteasome pathway. **Cancer Res.**, Chicago, v. 56, p. 4620-4624, 1996., p. v. 56, 4620-4624, 1996.
- BURD, E. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 16, n. 1, p. 1-17, 2003.
- BUZÁS, E. I. et al. Carbohydrate recognition systems in autoimmunity AU - Buzás, Edit I. **Autoimmunity**, Basel, v. 39, n. 8, p. 691-704, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/08916930601061470>>. Acesso em: 12 dez. 2018.

CARTER, J. J. et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.181, p. 1911-1919, 2000.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **J. Natl Cancer Inst. Monog.**, Cary, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12807941>>. Acesso em: 19 dez. 2018.

CASTLE, P. E. et al. Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade 2. **Obstet. Gynecol.**, Hagerstown, v. 113, n. 1, p. 18-25, 2009.

CLIFFORD, G. M. et al. Cancer risk in the {Swiss} {HIV} {Cohort} {Study}: associations with immunodeficiency, smoking, and highly active antiretroviral therapy. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 97, p. 425-432, 2005.

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. Bras. Reumatol.**, Campinas, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

DAM, T. K.; BREWER, C. F. Lectins as pattern recognition molecules: the effects of epitope density in innate. **Glycobiology**, Oxford, v. 20, p. 270-279, 2010.

DEGN, S. E. et al. MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 183, n. 11, p. 7371-7378, 2009. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0902388>>. Acesso em: 19 dez. 2018.

DEGN, S. E. et al. Biological variations of MASP-3 and MAp44, two splice products of the MASP1 gene involved in regulation of the complement system. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v. 361, n. 1-2, p. 37–50, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175910002024?via%3Dihub>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

DEGN, S. E. et al. Co-complexes of MASP-1 and MASP-2 associated with the soluble pattern-recognition molecules drive lectin pathway activation in a manner inhibitable by MAp44. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 191, n. 3, p. 1334 LP-1345, 2013. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/191/3/1334.abstract>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

DELIGEOROGLOU, E. et al. HPV infection: Immunological aspects and their utility in future therapy. **Infect. Dis. Obst. Gynecol.**, New York, v. 2013. Doi:10.1155/2013/540850.

DELVES, P.; ROITT, D. The immune system – first of two parts. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 343, p. 37-50, 2000.

DENNY, L.; QUINN, M.; SANKARANARAYANAN, R. Chapter 8: Screening for cervical cancer in developing countries. **Vaccine**, Kidlington v. 24, p. S71-S77, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X06007298?via%3Dihub>>. Acesso em: 16 dez. 2018.

DOBO, J. et al. MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 183, n. 2, p. 1207-1214, 2009.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, n. Suppl. 5, p. F55-F70, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>>. Acesso em: 20 dez. 2018.

DOORSLAER, K. VAN; BURK, R. D. Evolution of human papillomavirus carcinogenicity. **Adv. Virus Res.**, New York, v.77, p. 41-62, 2010.

FALTER, K. J. et al. Human papillomavirus associated cancers as acquired immunodeficiency syndrome defining illnesses. **Rare Tumors**, v. 5, p. 93-94, 2013.

FRANK, M. Complement: a brief review. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 84, p. 411-420., 1989.

FRAUENKNECHT, V. et al. Plasma levels of mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases (MASPs) and MBL-associated protein in cardio- and cerebrovascular diseases. **Clin. Exp. Immunol.**, London, v. 173, n. 1, p. 112-120, 2013.

FREDERIKSEN, P. D. et al. Quantification of mannan-binding lectin. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v. 315, p. 49-60, 2006.

GARCÍA-PINERES, A. J. et al. Role of {DC}-{SIGN} in the activation of dendritic cells by HPV-16 L1 virus-like particle vaccine. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v. 36, p. 437-445, 2006.

GHOSH, P. et al. Role of complement and complement regulatory proteins in the complications of diabetes. **Endoc. Rev.**, Baltimore, v. 36, n. 3, p. 272-288, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1210/er.2014-1099>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

GUIMARAES, V. et al. Association between MBL2 gene functional polymorphisms and high-risk human papillomavirus infection in Brazilian women. **Hum. Immunol.**, New York, v. 69, n. 4-5, p. 273-278, 2008.

HÄNSCH, G. et al. The complement membrane attack complex stimulates the prostanoid production of cultured glomerular epithelial cells. **Arch. All. Appl. Immunol.**, Basel, v. 85, p. 87-93, 1988.

HARPER, D. M. et al. Efficacy of a bivalent {L}1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. **Lancet.**, London, v. 364, p.1757-1761, 2004.

HARRO, C. P. et al. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 {L}1 virus-like particle vaccine. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 93, p. 284- 292, 2001.

HASAN, U. A. et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 178, p. 3186-3197, 2007. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.178.5.3186>>. Acesso em: 15 dez. 2018.

HAUSEN, H. Human papilloma viruses and their possible role in squamous cell carcinomas. **Curr. top. Microbiol. Immunol.**, Berlin, v. 78, p. 1-30, 1977.

HÉJA, D. et al. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 109, n. 26, p. 10498 LP-10503, 2012. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/109/26/10498.abstract>>. Acesso em: 16 dez. 2018.

HO, G. Y. et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. **N. Engl. J. Med.**, Boston, 1998. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9459645](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9459645)>. Acesso em: 12 dez. 2018.

HOLMBERG, V. et al. Mutations of complement lectin pathway genes MBL2 and MASP2 associated with placental malaria. **Malaria J.**, London, v. 11, p. 1-9, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, I. . Informativo vigilância do câncer.

Disponível em:

<[https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document/informativo-vigilancia-do-cancer-n3-2012\\_0.pdf](https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document/informativo-vigilancia-do-cancer-n3-2012_0.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, I. Informativo vigilância do câncer. Disponível em:

<[https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document/informativo-vigilancia-do-cancer-n4-2013\\_1.pdf](https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document/informativo-vigilancia-do-cancer-n4-2013_1.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2019.

IP, W. K. et al. Serum mannose-binding lectin levels and mbl2 gene polymorphisms in different age and gender groups of southern {Chinese} adults. **Scand. J. Immunol.**, Oslo, v. 59, 310-314, 2004.

ITURRY-YAMAMOTO, G. R.; PORTINHO, C. P. Sistema complemento, ativação regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 47, p. 41-51, 2001.

IWAKI, D. et al. The role of mannose-binding lectin-associated serine protease-3 in activation of the alternative complement pathway. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 187, n. 7, p. 3751 LP-3758, 2011. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/content/187/7/3751.abstract>>. Acesso em: 20 jan. 2019.

JANEWAY JR., C. A, MEDZHITOV, R. Innate immunity recognition. **Ann. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 20, p. 197-216, 2002.

JENNY, L. et al. MASP-1 of the complement system promotes clotting via prothrombin activation. **Mol. Immunol.**, Oxford, v. 65, n. 2, p. 398405, 2015.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589015000541>>. Acesso em: 14 dez. 2019.

JENSEN, K. E. et al. Risk for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse in relation to smoking among women with persistent human papillomavirus infection. **Cancer Epidemiol., Biomark. Prev.**, Philadelphia, n.11, p. 1949-1955, 2012.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3970163&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 jan. 2019.

KANODIA, S, F. L. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 7, p. 79-89, 2007.

KADISH, A. S et al. Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus HPV infection is associated with cell-mediated immune responses to an hpv type 16 e 7 peptide. **Cancer Epidemiol. Biomark.**, Philadelphia, v. 11, p. 483, 2002.

KAISHO T., S. A. Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors. **Curr. Mol. Med.**, v. 3, 373-385, 2003.

KILPATRICK, D. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1572, p. 401-413, 2002.

KITCHENER, H. C.; CASTLE, P. E.; COX, J. T. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. **Vaccine**, Kidlington, v. 24, p. S63-S70, 2006. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X0600658X?via%3DiHub>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

KJAER, T. R.; THIEL, S.; ANDERSEN, G. R. Toward a structure-based comprehension of the lectin pathway of complement. **Mol. Immunol.**, Oxford, v. 56, n. 4, p. 413-422, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2013.05.007>>. Acesso em: 24 jan. 2019.

KLINGELHUTZ, A. J.; FOSTER, S. A; MCDUGALL, J. K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. **Nature**, London, v.380, p. 79-82, 1996.

LANDIS, S. H. **Cancer Statistics , 1999**. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.3322/canjclin.49.1.8>>. Acesso em: 20 jan. 2019.

LAW, S. K. A. **Complement**. Oxford: Ilpress, 1988. 72 p.

LIM, H. The complement system. Activation, modulation, and clinical relevance.

**Dermatol. Clin.**, Philadelphia, v. 8, p. 609-618, 1990.

MAESTRI, C. et al. Mannose binding lectin is not acting as a biomarker for the progression of pre-invasive lesions of invasive cervical cancer. **Med. Princ. Pract**, v. 330, Basel, p. 530–534, 2017. Disponível em:

<<https://www.karger.com/Article/FullText/485037>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

MCCREDIE, M. R. E. et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort

study. **Lancet Oncol.** London,, v. 9, n. 5, p. 425-434, 2008. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70103-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70103-7)>. Acesso em: 26 jan. 2019.

MCLAUGHLIN-DRUBIN, M.; MÜNGER, K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. **Virus Res.**, Amsterdam, v. 143, p. 95-208, 2008.

MEDZHITOV, R. J. C. J. Innate immunity. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 343, p. 338-344, 2000.

MÜNGER, K, H. P. M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus Res.**, Amsterdam, v. 89, p. 213-228, 2002.

NEVADUNSKY, N. S. et al. Annose-binding lectin codon 54 genetic polymorphism and vaginal protein levels in women with gynecologic malignancies. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, Amsterdam, v. 163, p. 216-218, 2012. doi: 10.1016/j.ejogrb.2012.04.020.

OROSZLÁN, G. et al. Extensive basal level activation of complement mannose-binding lectin-associated serine protease-3: kinetic modeling of lectin pathway activation provides possible mechanism. **Front. Immunol.** , v. 8, p. 1821, 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01821>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

OSTOR, G. A. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, New York, v. 12, n. 2, p. 186-192, 1993.

PALEFSKY, J. Human papillomavirus-associated malignancies in HIV-positive men and women. **Curr. Opin. Oncol.**, Philadelphia, v. 7, p. 437-441, 1995.

PALEFSKY, J. Anal cancer prevention in HIV-positive men and women. **Curr. Opin. Oncol.**, Philadelphia,, v. 21, p. 433-436, 2009.

PRENDIVILLE, W.; DAVIES, P. **HPV handbook.** 1: Human papillomavirus and cervical cancer. Abingdon: Taylor & Francis, 2004.

RICKLIN, D. et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nat. Immunol.**, New York, v. 11, p. 785-797, 2010.

RODEN, R.; WU, T.C. How will HPV vaccines affect cervical cancer? **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 10, p.753-763, 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3181152&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

RODRÍGUEZ, A. C. et al. Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2 / 3 : critical role of duration of infection. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v.102, p. 315-324, 2010. doi: 10.1093/jnci/djq001.

ROORYCK, C. et al. UKPMC Funders Group and MASP1 cause 3MC syndrome. **Nat. Genet.**, New York, v. 43, n. 3, p. 197-203, 2011.

ROTHER, K.; TILL, G. **The complement system.** cap.1: Phases of the complement system. Berlin: Springer-Verlag, 1988. p. 1-4.

SAEED, A. et al. Mannan binding lectin-associated serine protease 1 is induced by hepatitis C virus infection and activates human hepatic stellate cells. **Clin. Exp. Immunol.**, London, v. 174, p. 265-273, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/cei.12174>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

SAFAEIAN, M.; SOLOMON, D. Cervical cancer prevention - cervical screening: science in evolution. **Obstet. Gynecol. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 34, n. 4, p. 739-ix, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2762353/>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

SCHWAEBLE, W. J. et al. Targeting of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 confers protection from myocardial and gastrointestinal ischemia/reperfusion injury. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 108, n. 18, p. 7523-7528, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3088599/>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

SEGAT, L. et al. MBL2 gene polymorphisms are correlated with high-risk human papillomavirus infection but not with human papillomavirus-related cervical cancer. **Hum. Immunol.**, New York, v. 70, n. 6, p. 436-439, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2009.03.006>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

SELLORS, J. W.; SANKARANARAYANAN, R. **Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginners 'manual**. Geneva: International Agency for Research on Cancer, 2003.

SERAINA, S. et al. Serum concentrations of lectin-pathway components in healthy neonates, children and adults: mannan-binding lectin (MBL), M-, L-, and H-ficolin, and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2). **Pediatr. Allergy Immunol.**, Copenhagen, v. 22, n. 4, p. 424-430, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2010.01104.x>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

SILVA, W.D, KIPNIS, T. L. Sistema complemento: um engenhoso mecanismo bioquímico, um co-participante na defesa natural e um mediador de interações celulares. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 30, p. 67-72, 1984.

SIRMACI, A. et al. MASP1 mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of carnevale, malpuech, OSA, and michels syndromes. **Am. J. Hum. Gen.**, Baltimore, v. 87, n. 5, p. 679-686, 2010.

SMEDBRÅTEN, J. et al. Low level of MAp44, an inhibitor of the lectin complement pathway, and long-term graft and patient survival; a cohort study of 382 kidney recipients. **BMC Nephrol.**, London, v. 17, n. 1, p. 148, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27760523>http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5070230http://bmcnephrol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12882-016-0373-9>. Acesso em: 16 jan. 2019.

STANLEY, M. HPV - immune response to infection and vaccination. **Infect. Agent Cancer**, v. 5, p. 19, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20961432>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

STANLEY, M. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 25, n. 2, p. 215-222, 2012.

STOLER, M.; SCHIFFMAN, M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: Realistic estimates from the ascus-lsil triage study. **JAMA**, Chicago, v. 285, n. 11, p. 1500-1505, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1001/jama.285.11.1500>>. Acesso em: 20 jan. 2019.

SYRJÄNEN, K. J. Two landmark studies published in 1976/1977 paved the way for the recognition of human papillomavirus as the major cause of the global cancer burden. **Acta Cytol.**, Baltimore, v. 61, n. 4-5, p. 316-337, 2017. doi: 10.1159/000477372. Acesso em: 16 jan. 2019.

TAKAHASHI, M. et al. Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway. **J. Immunol.**, Baltimore, v.180, p. 6132-6138, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18424734>%5Cn<http://www.jimmunol.org/content/180/9/6132.full.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

TEIXEIRA, J. et al. Cervical cancer registered in two developed regions from Brazil: upper limit of reachable results from opportunistic screening. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 6, p. 347-353, 2018. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0038-1660841>>. Acesso em: 23 set. 2018.

THIEL, S. et al. 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.**, London, v. 169, p. 38-48, 2012.

TSAI, C. C. et al. Mannose-binding lectin in high-risk human papillomavirus infection. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 200, n. 6, p. 618.e1-6, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19371855>>. Acesso em: 23 set. 2018.

TURNER, M. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Mol. Immunol.**, Oxford, v. 40, p. 423-429, 2003.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Cancer Statistics Working Group. U.S. Cancer statistics data visualizations tool, based on November 2017 submission data (1999-2015). Disponível em: <[www.cdc.gov/cancer/dataviz](http://www.cdc.gov/cancer/dataviz)>. Acesso em: 23 jan. 2019.

VASTA, G. R. Roles of galectins in infection. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v.7, p. 424-438, 2009.

VILLIERS, E. M. Heterogeneity of the human papillomavirus group. **J. Virol.**, Washington, v. 63, n. 11, p. 4898-4903, 1989. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=251129&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23 set. 2018.

WARD, P. A.; GUO, R. F.; RIEDEMANN, N. C. Manipulation of the complement system for benefit in sepsis. **Crit. Care Res. Pract.**, 2012. doi: 10.1155/2012/427607.

WILLIAMS, L. W.; BURKS, A. W.; STEELE, R. W. Complement: function and clinical

relevance. **Ann. Allergy**, St. Paul, v. 60, p. 293-301, 1988.

WOODMAN, C. B. J. et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: A longitudinal cohort study. **Lancet**, London, v. 357, n. 9271, p. 1831-1836, 2001.

YAMAMOTO, K. M. S. Mechanisms for the spontaneous formation of covalently linked polymers of the terminal membranolytic complement protein C9. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 258, p. 7887-9788, 1983.

YTTING, H. et al. 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.**, Oslo, v. 66, p. 458-464, 2007.

ZAHNISER, D. J.; SULLIVAN, P. J. CYTYC Corporation. **Acta Cytol.**, Baltimore, v. 40, n. 1, p. 37-44, 1996.

ZEFERINO, L. C. et al. Organization of cervical cancer screening in Campinas and surrounding region, São Paulo State, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 9, p. 1909-1914, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X2006000900022&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2006000900022&lng=en&tlng=en)>. Acesso em: 14 dez. 2018.

ZHANG, B.; SPANDAU, D. F.; ROMAN, A. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. **J. Virol.**, Washington, v. 76, p. 220-231, 2002.

ZHANG, N. et al. Association of levels of mannose binding lectin and the MBL2 gene with type 2 diabetes and diabetic nephropathy. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, p. e83059, 2013.