

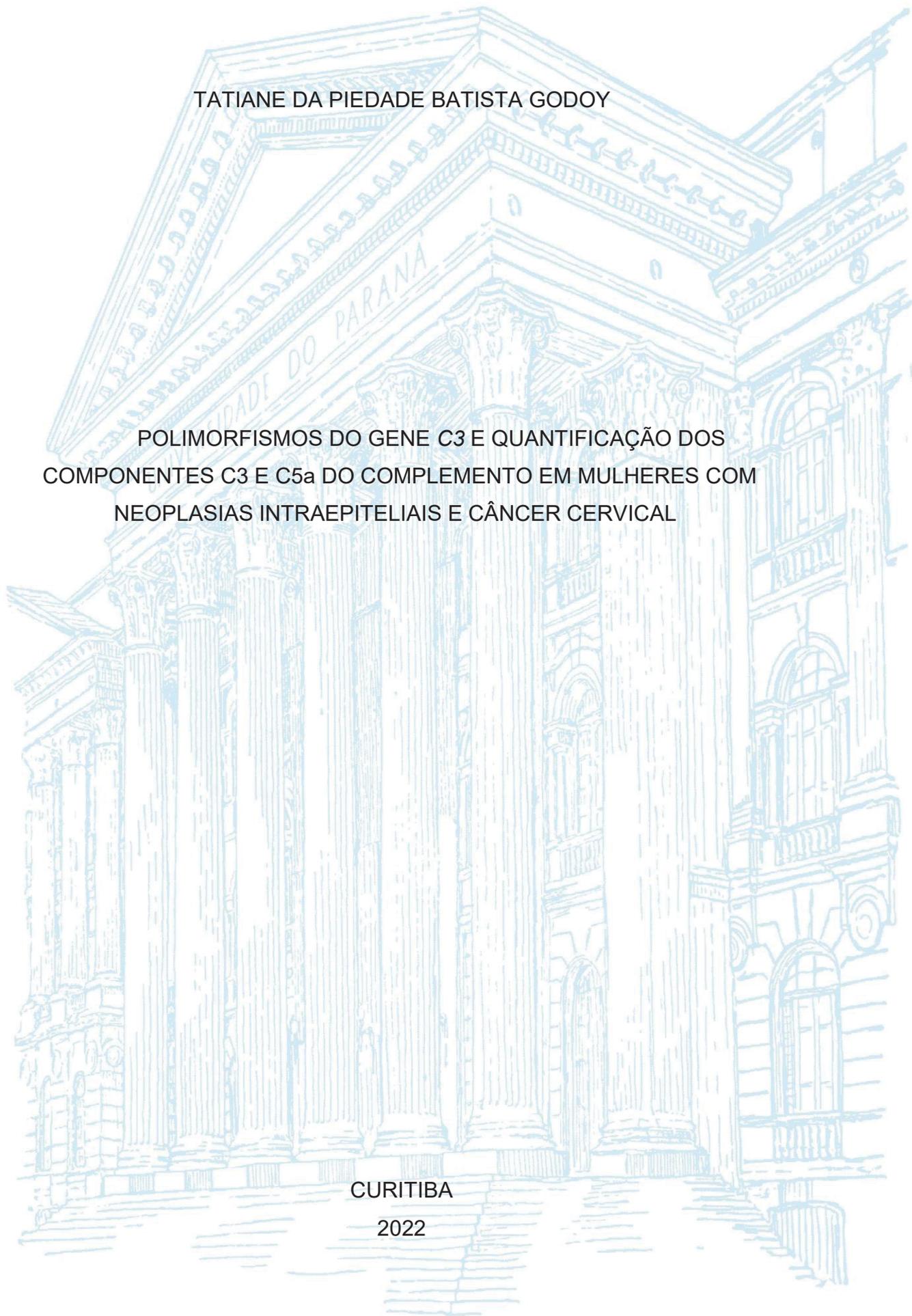
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TATIANE DA PIEDADE BATISTA GODOY

POLIMORFISMOS DO GENE C3 E QUANTIFICAÇÃO DOS
COMPONENTES C3 E C5a DO COMPLEMENTO EM MULHERES COM
NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS E CÂNCER CERVICAL

CURITIBA

2022



TATIANE DA PIEDADE BATISTA GODOY

POLIMORFISMOS DO GENE C3 E QUANTIFICAÇÃO DOS
COMPONENTES C3 E C5a DO COMPLEMENTO EM MULHERES COM
NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS E CÂNCER CERVICAL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Interna e Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Antunes de Andrade

Coorientadora: Profa. Dra. Iara J. de Messias Reason

Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Savio de Araújo Souza

CURITIBA

2022

G859 Godoy, Tatiane da Piedade Batista
Polimorfismos do gene c3 e quantificação dos componentes
c3 e c5a do complemento em mulheres com neoplasias
intraepiteliais e câncer cervical [recurso eletrônico] / Tatiane da
Piedade Batista Godoy. – Curitiba, 2022.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências
da Saúde. Universidade Federal do Paraná.
Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Antunes de Andrade
Coorientadoras: Profa. Dra. Iara J. de Messias Reason
Profa. Dra. Patrícia Savio de Araújo Souza

1. Complemento C3. 2. Complemento C5a. 3. Neoplasias
do colo do útero. 4. Neoplasia Intraepitelial Cervical. I. Andrade,
Fabiana Antunes de. II. Messias-Reason, Iara J. de. III. Souza,
Patrícia Savio de Araújo. IV. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da
Saúde. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

NLM: WP 480



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
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 MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de TATIANE DA PIEDADE BATISTA GODOY intitulada: " POLIMORFISMOS DO GENE C3 E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES C3 E C5a DO COMPLEMENTO EM MULHERES COM NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS E CÂNCER CERVICAL .", sob orientação da Profa. Dra. FABIANA ANTUNES DE ANDRADE, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra 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, 18 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica

18/03/2022 17:47:43.0

FABIANA ANTUNES DE ANDRADE

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

21/03/2022 10:46:02.0

KAREN BRAJÃO DE OLIVEIRA

Avaliador Externo (DPTO CIÊNCIAS PATOLÓGICAS - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)

Assinatura Eletrônica

21/03/2022 11:15:12.0

KÁRITA CLÁUDIA FREITAS LIDANI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua General Carneiro, 181 - Prédio Central - 11º Andar - Curitiba - Paraná - Brasil
CEP 80060-150 - Tel: (41) 3360-1099 - E-mail: ppgmedicina@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 166091

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 166091

Dedico, com muito carinho, este trabalho a todas as mulheres que hoje travam a batalha contra o câncer cervical. Dedico em especial, às mulheres que acreditaram na ciência e aceitaram gentilmente participar deste estudo.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Fabiana Antunes de Andrade pela paciência e por todos os ensinamentos.

À Profa. Dra. Iara J. de Messias Reason por incentivar e despertar em mim o interesse na área de Imunologia, principalmente o maravilhoso Sistema Complemento.

À Profa. Dra. Patrícia Savio de Araújo Souza pela disposição em esclarecer todas as dúvidas que surgiram no decorrer da pesquisa.

À Profa. Dra. Lorena Bavia pela padronização do ELISA para o componente C3, e por compartilhar comigo todo o seu conhecimento sobre o Sistema Complemento.

Ao Prof. Dr. Renato Mitsunori Nisihara pela dosagem do componente C5a.

As minhas amigas do laboratório LIMP Edineia, Helena, Nathalia, Sandra e Pamela por toda ajuda e incentivo.

À minhas queridas amigas Camila de Freitas e Fernanda Berti pelas longas discussões sobre metodologia da pesquisa e complemento, além da parceria nas coletas de sangue.

Ao Rosaldo e a toda equipe do laboratório de coleta de sangue do HC.

Ao Hospital Erasto Gaertner e à Unidade Básica de Saúde Nossa Senhora Aparecida, pelo auxílio na obtenção das amostras, e pelo carinho e cuidado com as pacientes.

Ao PPG Medicina Interna e Ciências da Saúde e a Capes por possibilitar a realização deste sonho.

A minha família e ao meu amor Gabriel, por sempre estarem ao meu lado.

RESUMO

O Câncer Cervical (CC) é a quarta principal causa de morte por câncer em mulheres no mundo, sendo que a infecção persistente por papilomavírus humano (HPV) associada a fatores genéticos e imunológicos são necessários para o desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) e CC. O Sistema Complemento (SC) faz parte da imunidade inata, e seus componentes centrais C3 e C5a já foram associados a diversos tipos de câncer como mama, pulmão e ovário. Neste estudo avaliamos a associação de polimorfismos do gene C3 em CC, bem como os níveis séricos dos componentes C3 e C5a em NIC I, II e CC. Os polimorfismos do gene C3 (rs2250656, rs2230199 e rs1047286) foram avaliados por PCR de sequência específica em um total de 86 mulheres com CC e 78 controles. Os níveis séricos foram avaliados por método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), sendo quantificados para o componente C3 40 mulheres (NIC I = 15, NIC II = 14 e CC= 11) e 66 controles, e os níveis séricos do C5a em 40 pacientes (NIC I = 15, NIC II =14 e CC= 11) e 50 controles. Os resultados demonstraram que os níveis séricos do C3 foram significativamente menores em mulheres com NIC I (média: $82,0 \pm 9,7$ mg/dl; $p=0,001$), NIC II (média: $85,9 \pm 21,7$ mg/dl; $p=0,019$), NIC I/II (média: $83,9 \pm 16,4$ mg/dl; $p=0,002$) e CC (média: $87,2 \pm 28,0$ mg/dl; $p=0,049$) que no grupo controle saudável (média: $106,8 \pm 23,7$ mg/dl). Esses resultados sugerem um papel do C3 na fisiopatologia de lesões pré-invasivas e CC. O papel do C3 no CC parece não estar relacionado aos polimorfismos avaliados.

Palavras-chaves:

Componente C3; Componente C5a; complemento; câncer cervical; neoplasias intraepiteliais cervicais.

ABSTRACT

Cervical Cancer (CC) is the fourth leading cause of cancer death in women worldwide, and persistent human papillomavirus (HPV) infection associated with genetic and immunological factors are necessary for the development of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and CC. The Complement System (SC) is part of innate immunity, and its central components C3 and C5a have already been associated with several types of cancer such as breast, lung and ovary. In this study, we evaluated the association of C3 gene polymorphisms in CC, as well as the serum levels of C3 and C5a components in CIN I, II and CC. C3 gene polymorphisms (rs2250656, rs2230199 and rs1047286) were evaluated by sequence-specific PCR in a total of 86 women with CC and 78 controls. Serum levels were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), being quantified for the C3 component in 40 women (CIN I = 15, CIN II = 14 and CC= 11) and 66 controls, and C5a serum levels in 40 patients (CIN I = 15, CIN II =14 and CC= 11) and 50 controls. The results showed that C3 serum levels were significantly lower in women with CIN I (mean: 82.0 ± 9.7 mg/dl; $p=0.001$), CIN II (mean: 85.9 ± 21.7 mg/dl ; $p=0.019$), CIN I/II (mean: 83.9 ± 16.4 mg/dl; $p=0.002$) and CC (mean: 87.2 ± 28.0 mg/dl; $p=0.049$) than in the group healthy control (mean: 106.8 ± 23.7 mg/dl). These results suggest a role for C3 in the pathophysiology of pre-invasive lesions and CC. The role of C3 in CC appears to be unrelated to the polymorphisms evaluated.

Keywords:

Component C3; Component C5a; complement; cervical cancer; cervical intraepithelial neoplasia.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - AMOSTRA CIRÚRGICA DE UMA EXCISÃO SUSPEITA DE CÂNCER CERVICAL	21
FIGURA 2 - PRIMEIRAS AÇÕES EDUCATIVAS NO BRASIL AO COMBATE DO CÂNCER CERVICAL	23
FIGURA 3 - TREM ADAPTADO PARA REALIZAÇÃO DE CONSULTAS E EXAMES PREVENTIVOS NA DÉCADA DE 1970 NO BRASIL	24
TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2020 EM MULHERES (EXCETO PELE NÃO MELANOMA).....	26
FIGURA 5 - ESTRUTURA E EPITÉLIOS DO COLO UTERINO.....	29
FIGURA 6 - ESQUEMA DA ZONA DE TRANSFORMAÇÃO CERVICAL	30
FIGURA 7 - EFEITO DA INFECÇÃO POR HPV ONCOGÊNICO EM EPITÉLIOS ESCAMOSOS IMATUROS	31
FIGURA 8 - HISTÓRIA NATURAL DO CÂNCER CERVICAL.....	32
FIGURA 9 - CRONOLOGIA E EVOLUÇÃO NATURAL DAS LESÕES PRÉ-CANCEROSAS E DO CÂNCER CERVICAL	33
FIGURA 10 - PRINCIPAIS VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO ..	36
FIGURA 11 - ANATOMIA ESTRUTURAL DO COMPONENTE C3.....	37
FIGURA 12 - POLIMORFISMOS rs2230199 E rs1047286	41
FIGURA 13 - CITÓLISE TUMORAL MEDIADA PELO SISTEMA COMPLEMENTO NO CONTEXTO mAb	44
FIGURA 14 - PROTEÍNAS REGULADORAS DO SISTEMA COMPLEMENTO.....	45
FIGURA 15 - PCR-SSP MULTIPLEX PARA SNPS DO GENE C3 – PADRÃO ELETROFORÉTICO	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E CARACTERÍSTICAS DA SAÚDE REPRODUTIVA DO GRUPO DE CONTROLE E CC.....	49
TABELA 2 - FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS SNPS DO GENE C3 SELECIONADOS	51
TABELA 3 - SEQUÊNCIA DOS INICIADORES E TAMANHO DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS	52
TABELA 4 - INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO E ATRIBUIÇÃO DE GENÓTIPO	54

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

CC - câncer cervical

CCE - carcinoma de células escamosas

CDC - citotoxicidade dependente do complemento

DAF - fator de aceleração de decaimento

DAMPs - padrões moleculares associados ao dano

FB - fator B

FD- fator D

FH – fator H

HIV - vírus da imunodeficiência humana

HPV - papilomavírus humano

JEC - junção escamocolunar

mAb - anticorpo monoclonal

MAC - complexo de ataque à membrana

MBL - lectina de ligação à manose

MCP - proteína cofator de membrana

mCRPs - proteínas reguladoras do complemento ligadas à membrana

MDSC - células supressoras derivadas de origem mielóide

NIC - neoplasia intraepitelial cervical

PAMPs - padrões moleculares associados aos patógenos

SC - sistema complemento

SNP - polimorfismos de nucleotídeo único

TED - domínio contendo o tioéster

VA - via alternativa

VC - via clássica

VL - via das lectinas

ZT - zona de transformação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	18
1.2 OBJETIVOS	19
1.2.1 Objetivo geral	19
1.2.2 Objetivos específicos.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 LESÕES PRECURSORAS E CÂNCER CERVICAL	20
2.1.1 Uma doença da mulher: breve histórico do câncer cervical	20
2.1.2 Epidemiologia do câncer cervical	25
2.1.3 Cofatores.....	26
2.1.4 Fisiopatologia	27
2.1.5 História natural do câncer cervical.....	31
2.2 SISTEMA COMPLEMENTO.....	33
2.2.1 Componente C3 do Sistema Complemento	36
2.2.2 Componente C5a do Sistema Complemento	38
2.2.3 Polimorfismos do gene C3	38
2.3 SISTEMA COMPLEMENTO NO CÂNCER	42
2.3.1 Sistema complemento e imunoterapia no câncer.....	43
2.3.2 Componentes C3 e C5a no câncer	45
3 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA.....	48
3.1.1 Classificação do tipo de pesquisa	48
3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA.....	48
3.1.2 Pacientes.....	48
3.1.3 Grupo Controle	49
3.2 MÉTODOS	51
3.2.1 Extração de DNA.....	51
3.2.2 Seleção de SNPs de interesse do gene C3 e desenho de primers	51
3.2.3 Reação em cadeia da polimerase com iniciadores de sequência específica (PCR-SSP).....	52

3.2.4 Corrida eletroforética	53
3.2.5 Dosagem dos componentes C3 e C5a do complemento	54
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
4 RESULTADOS.....	56
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
6 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS.....	80
APÊNDICE 1 – FICHA CADASTRAL.....	87
APÊNDICE 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	89
ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	91

1 INTRODUÇÃO

O câncer cervical (CC) é o quarto tipo de câncer mais incidente e a quarta principal causa de morte por câncer em mulheres, com uma estimativa de 604.000 novos casos e 342.000 mortes em todo o mundo em 2020 (SUNG et al., 2021). Apesar da redução de incidência e mortalidade nas últimas décadas devido à triagem eficaz e o tratamento do câncer em muitos países de alta renda, o CC ainda apresenta elevado índice de mortalidade, sendo a quarta principal causa de morte por câncer em mulheres (BRAY et al., 2018). O CC é um importante problema de saúde pública, tendo como causa necessária para seu desenvolvimento a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), associado a cofatores como imunossupressão (particularmente pelo vírus da imunodeficiência humana - HIV), tabagismo, maior número de gestações e o uso prolongando de contraceptivos orais (BRAY et al., 2018). O contágio pelo HPV é umas das infecções virais transmitida sexualmente mais comuns. A maior taxa de prevalência de HPV é observada em mulheres com menos de 25 anos e reduz em idades posteriores, havendo um pico secundário na perimenopausa (BOSCH et al., 2013). Pacientes jovens infectadas geralmente eliminam o vírus sem apresentar evidência clínica clara, possivelmente devido a uma resposta imune eficaz mediada por células, ocasionado à regressão das lesões (DOORBAR et al., 2012). A inabilidade do sistema imunológico em eliminar o vírus, resulta na persistência do processo infeccioso que, no caso de HPVs oncogênicos, cria uma maior probabilidade do desenvolvimento de lesões pré-câncer (denominandas de neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) que podem ser de grau I, II ou III) e, conseqüentemente em CC (DOORBAR et al., 2012).

O sistema complemento (SC) é reconhecido como um braço efetor do sistema imune inato, atuando na eliminação de patógenos e debris celulares, além de regular uma série de processos imunológicos e inflamatórios, bem como na lise de células tumorais (PIO; AJONA; LAMBRIS, 2013). Constituído por mais de 50 proteínas plasmáticas, receptores celulares e reguladores, o SC pode ser ativado através de três vias principais: via clássica (VC) via das lectinas (VL) e via alternativa (VA) (REIS et al., 2017). Ambas as vias convergem para a clivagem do principal componente da cascata, o componente C3, originando os fragmentos C3a e C3b. O fragmento C3a é uma anafilatoxina que atua no recrutamento e ativação de células efetoras da resposta inflamatória, e o C3b se liga a superfície de patógenos e

células tumorais sinalizando para fagocitose (RICKLIN et al., 2016). O C3b também é componente da C5 convertase, um complexo enzimático que cliva C5 produzindo o fragmento C5a uma potente anafilotoxina, e C5b que contribui para a formação do complexo de ataque à membrana (MAC; C5b-9) conduzindo a lise da célula alvo (BAYLY-JONES; BUBECK; DUNSTONE, 2017; KONDOS et al., 2010).

O componente C3 é a proteína mais versátil e multifuncional do SC, com características estruturais extraordinárias que permitem interagir de maneira específica a inúmeras outras proteínas (SAHU; LAMBRIS, 2001). Níveis elevados da componente C3 foram observados em pacientes com câncer de pâncreas (HANAS et al., 2008); adenocarcinoma ductal pancreático (CHEN et al., 2013); câncer de mama, câncer colorretal e câncer de pulmão (DOWLING et al., 2012); carcinoma de tireoide (YEKTA et al., 2018) bem como em pacientes NIC III positivas para HPV-16 (CANALES et al., 2014) e CC (JEONG et al., 2008), indicando que C3 possa atuar como um biomarcador e até mesmo como possível alvo terapêutico no tratamento de alguns tipos de cânceres. Já o componente C5a parece criar um microambiente favorável para a progressão tumoral, atuando no recrutamento de células supressoras derivadas de origem mielóide (MDSC), as quais suprimem a resposta antitumoral mediada por células T CD8+, favorecendo o crescimento do tumor (MARKIEWSKI et al., 2008).

Contudo o papel dos componentes C3 e C5a bem como o impacto dos polimorfismos do gene C3 na fisiopatologia das lesões cervicais pré-câncer e CC ainda não é completamente esclarecido. A busca por biomarcadores que facilitem o rastreamento das lesões cervicais pré-câncer e CC é fundamental para contribuir para a redução da mortalidade deste câncer em países em desenvolvimento. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar a associação de polimorfismos do gene C3 em CC, bem como os níveis séricos das proteínas C3 e C5a em NIC I, NIC II e CC.

1.1 JUSTIFICATIVA

Apesar do CC ser uma doença evitável e com alto potencial de cura se detectado e tratado precocemente, continua sendo um dos cânceres mais comuns e com alta mortalidade em países em desenvolvimento. A baixa aderência do exame citopatológico na rotina de muitas mulheres devido a fatores religiosos, culturais, bem como a menor cobertura do exame em regiões de difícil acesso, demonstram a necessidade do desenvolvimento de marcadores laboriais.

Portanto, a investigar a associação das concentrações séricas dos componentes C3 e C5a do SC, bem como de polimorfismos do gene C3 poderiam ser úteis no rastreio de lesões cervicais pré-câncer e câncer cervical contribuindo para detecção precoce desta enfermidade.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Investigar o papel dos componentes C3 e C5a do sistema complemento, bem como os polimorfismos do gene C3 (rs2250656, rs2230199 e rs1047286) como potenciais marcadores de lesões cervicais pré-câncer e câncer cervical.

1.2.2 Objetivos específicos

- Verificar a associação entre polimorfismos do gene C3 rs2250656, rs2230199 e rs1047286) em mulheres com câncer cervical;
- Avaliar a associação entre os polimorfismos do gene C3 (rs2250656, rs2230199 e rs1047286) e os diferentes tipos histológicos de câncer cervical;
- Investigar a associação entre concentrações séricas dos componentes C3 e C5a em neoplasias intraepiteliais cervicais de grau I, II e câncer cervical.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LESÕES PRECURSORAS E CÂNCER CERVICAL

O câncer do colo do útero também chamado de câncer cervical (CC) é caracterizado pela replicação desordenada do epitélio que reveste o colo do útero, podendo comprometer o tecido conjuntivo subjacente e invadir outros órgãos. Os carcinomas invasores podem ser classificados dependendo da origem do epitélio comprometido em: carcinoma epidermoide, tipo mais incidente e que acomete o epitélio escamoso (representa 90% dos casos), e o adenocarcinoma que acomete o epitélio glandular (cerca de 10% dos casos) (INCA, 2022a).

O CC é um dos é um dos pouquíssimos cânceres dos quais a fase pré-maligna (lesões precursoras) dura muitos anos antes de se converter em câncer invasivo, o que permite ampla oportunidade para a detecção e tratamento. Infelizmente, embora a prevenção seja possível, milhares de mulheres ainda morrem todos os anos por este tipo de câncer (OPAS, 2016).

2.1.1 Uma doença da mulher: breve histórico do câncer cervical

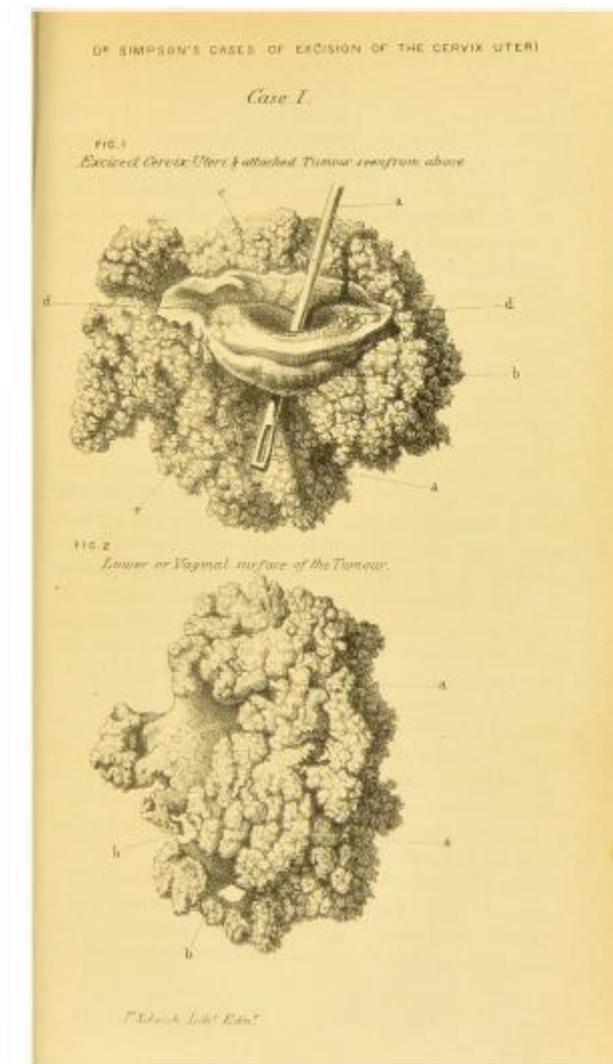
Câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células, que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos (INCA, 2020). A palavra câncer deriva grego *karkínos* que significa caranguejo, e foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates (conhecido como pai da medicina), ao observar que a que a espessura e formato dos vasos sanguíneos que nutrem os tumores se assemelham as garras de um caranguejo (FEINBERG; OHLSSON; HENIKOFF, 2006; INCA, 2020).

O CC é há pelo menos dois milênios considerado o "câncer da mulher", sendo que a sua definição patológica não era bem esclarecida até metade do século XIX (JENKINS, 2020). Nesta época, a medicina pouco se interessava em problemas femininos, despertando interesse apenas no dizia respeito à reprodução e a gestação (CARVALHO; QUEIROZ, 2010). Devido à falta de conhecimentos e a ausência de sintomas que indicavam o início do CC, fazia dela uma doença silenciosa, detectada pelos médicos apenas quando as pacientes manifestavam

sintomas em estágio avançado, como sangramento vaginal descontrolado e corrimento com dor intensa (JENKINS, 2020).

Com o advento da anestesia, a cirurgia de retirada do colo do útero (histerectomia) se tornou padrão para conter o tumor, embora houvesse pouca sobrevida das pacientes em longo prazo (FIGURA 1) (JENKINS, 2020). A cirurgia era realizada em todas as pacientes que apresentavam lesões, pois a incerteza da progressão em câncer invasivo levava os ginecologistas vê-las como verdadeiras malignidades e, portanto, deviam ser retiradas (LÖWY, 2010). Alguns profissionais relutavam em realizar este procedimento em mulheres jovens e férteis diagnosticadas com lesões cervicais superficiais (LÖWY, 2010).

FIGURA 1 - AMOSTRA CIRÚRGICA DE UMA EXCISÃO SUSPEITA DE CÂNCER CERVICAL



FONTE: Jenkins (2020)

NOTA: Amostra de colo do útero excisado pelo ginecologista Sir James Simpson alguns anos antes de introduzir a anestesia na obstetrícia. Infelizmente, isso pode muito bem ser um condiloma gigante, e não um câncer. A paciente teve uma gravidez e sobreviveu 6 anos após a cirurgia (JENKINS, 2020)

No início dos anos 1900 a radioterapia passou a ser empregada para tratar doenças malignas ginecológicas, gerando uma menor mortalidade que a cirurgia radical (JENKINS, 2020). Porém no Brasil, independentemente da terapia utilizada, a percentagem de cura era mínima. O atendimento médico à população era feito por um pequeno número de instituições filantrópicas, ou por médicos privados e clínicas que atendiam as camadas com maior poder aquisitivo (TEIXEIRA, 2015). Os serviços públicos de saúde estavam voltados a ações contra epidemias, deste modo a maioria da população feminina brasileira era vitimada pela doença, sem mesmo saber do que padeciam, ou a forma adequada de se tratar (TEIXEIRA, 2015).

Desde 1800 especulava-se qual era a causa que desencadeava o CC. Em 1842 o médico italiano, Domenico Rigoni-Stern publicou um artigo com uma série de estatísticas de mortalidade de mulheres na cidade de Verona, e observou que a alta frequência de CC era mais presente em mulheres viúvas e prostitutas do que em virgens e freiras, sugerindo que este tipo de câncer estava de alguma forma relacionada à atividade sexual (ZUR HAUSEN, 2009). No início da década de 80, Harold zur Hausen e colaboradores comprovaram que o vírus HPV estaria relacionado ao desenvolvimento do CC (ZUR HAUSEN, 2009).

Nas décadas de 1920 e 1930, em virtude da inexistência de uma terapêutica eficaz e a imprevisão da evolução do câncer, os médicos postulavam que a melhor forma de controlá-lo era propor ações educativas para que a população feminina procurasse atendimento médico nos primeiros sintomas (FIGURA 2) (JENKINS, 2020; LÖWY, 2010). Com a pressão para desvendar um método de diagnóstico que pudesse detectar o CC em estágios iniciais, em 1924, o ginecologista alemão Hans Hinselman construiu o colposcópico, aparelho tipo uma lupa que permite visualizar o colo do útero. Em 1928, Walter Schiller adicionou a coloração com iodo diluído (lugol) no colo do útero, o que permitiu a observação das alterações celulares cervicais, uma vez que as regiões anormais não absorvem a coloração (JENKINS, 2020; TEIXEIRA, 2015).

FIGURA 2 - PRIMEIRAS AÇÕES EDUCATIVAS NO BRASIL AO COMBATE DO CÂNCER CERVICAL



FONTE: Brasil (2011)

NOTA: Cartazes educativos do Serviço Nacional do Câncer, 1940. Diversas ações educativas no Brasil transmitiam para população a noção de que o câncer, se descoberto em sua fase inicial, oferecia mais chances de cura. Era comum o uso de metáforas militares como luta, guerra, na tentativa de mostrar a gravidade da doença se negligenciada.

O conceito de que o CC era precedido por lesões pré-cancerígenas foi proposta pelo ginecologista austríaco Walther Schauenstein, e que foi fundamental para que Georges Papanicolaou em conjunto com Herbert Traut em 1941, desenvolvessem a triagem citológica, baseada no reconhecimento de lesões pré-cancerosas através de esfregaços do colo uterino (REYNOLDS; TANSEY, 2009). Este método de triagem citológico ficou conhecido como exame Papanicolau, e é utilizado até os dias atuais em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil como forma de prevenção e diagnóstico das lesões precursoras e do CC.

Rapidamente adotado por médicos ginecologistas nas décadas de 1950 a 1970, o uso do exame Papanicolau variava em diversos países devido a interesses políticos e das áreas médicas. No Brasil, este exame era feito em mulheres que frequentavam os postos por outros problemas de saúde, mas logo passou a ser realizado em mulheres saudáveis através de campanhas. Unidades móveis como ônibus e vagões de trem foram adaptados para realizar consultas e exames preventivos (FIGURA 3) (TEIXEIRA, 2015).

FIGURA 3 - TREM ADAPTADO PARA REALIZAÇÃO DE CONSULTAS E EXAMES PREVENTIVOS NA DÉCADA DE 1970 NO BRASIL



FONTE: Brasil (2011)

Atualmente, o Brasil reúne esforços para combater o CC através de campanhas, programas e ações educativas, porém, os números de mortalidade continuam altos, sendo considerado um problema de saúde pública no Brasil (INCA 2020, CRUZ; LOUREIRO, 2008). A falta de conhecimento das populações mais pobres sobre a importância do Papanicolau, bem como a menor cobertura do exame em regiões menos populosas como o Norte e Centro-Oeste (onde também se encontram as maiores taxas de CC do Brasil), faz com que muitas mulheres não incorporem o exame na sua rotina (TEIXEIRA, 2015).

Outras questões além do acesso ao exame levam a não adesão de muitas mulheres às campanhas: a exposição do corpo e a sensação de impotência devido à posição ginecológica; a postura dos profissionais de saúde, agindo de forma corriqueira e sem importância; vergonha pela possibilidade de ser executado por homens; medo do resultado, e o estigma em relação à doença. Esses e outros fatores contribuem para que as metas para combater o CC não sejam atingidas (CRUZ; LOUREIRO, 2008).

Considerando que o HPV é condição necessária para o desenvolvimento de CC, em 2014 Ministério da Saúde adotou no Sistema Único de Saúde a vacinação

gratuita quadrivalente que confere proteção contra HPVs de baixo risco (HPV 6 e 11) e de alto risco (HPV 16 e 18) em meninas de 9 a 13 anos de idade. Em 2017, as meninas de 14 anos também foram incluídas, e o esquema vacinal foi ampliado para meninos de 11 a 14 anos. Esta faixa etária foi estabelecida por desenvolver maior produção de anticorpos e pela menor exposição ao vírus através de relações sexuais, apresentando maiores benefícios da vacina (INCA, 2021).

É importante ressaltar que a vacinação é uma ferramenta de prevenção primária e não substitui o rastreamento do câncer pelo exame de Papanicolau, pois não confere proteção contra outros subtipos oncogênicos de HPV. Além disso, mulheres e meninas acima da faixa etária estipulada e que não receberam a vacina, devem continuar realizando o exame preventivo (CANFELL, 2019). Como as vacinas são direcionadas a pré-adolescentes ou jovens, levam-se décadas para que seus benefícios de prevenção do câncer sejam observados, reduzindo a incidência CC, bem como os resultados de mortalidade (CANFELL et al., 2020).

Compreender o contexto histórico, as campanhas e estratégias no combate ao CC, nos permite refletir sobre o atual conhecimento da doença, além de fornecer uma ligação de como ela foi e ainda é vista em algumas sociedades, o que se torna relevante para orientar as tentativas de erradicação global do CC (JENKINS, 2020).

2.1.2 Epidemiologia do câncer cervical

Em todo o mundo, o CC é o quarto câncer mais frequente na população feminina, com um número estimado de 570 mil novos casos, sendo responsável por cerca de 311 mil óbitos em 2018 (WHO, 2020). Cerca de 85% das mortes, ocorrem em regiões subdesenvolvidas, o que pode estar relacionado com o acesso limitado a medidas preventivas e acesso ao tratamento da doença em estágio avançado, como cirurgias de câncer, radioterapia e quimioterapia (WHO, 2020).

Países desenvolvidos possuem menor incidência CC, pois existem programas de vacinação contra HPV, rastreamento e a triagem de mulheres, permitindo identificar lesões pré-cancerígenas em estágios iniciais, e que podem ser facilmente tratadas. O tratamento precoce evita até 80% do CC nestes países (WHO, 2020).

No Brasil, o CC é o terceiro tipo de câncer mais frequente na população feminina, atrás somente de câncer de mama e colorretal (exceto casos de pele não

melanoma). Para 2020, foram esperados 16.590 casos novos, com um risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2019).

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2020 EM MULHERES (EXCETO PELE NÃO MELANOMA)

	Localização Primária	Casos	%
Mulheres 	Mama feminina	66.280	29,7%
	Cólon e reto	20.470	9,2%
	Colo do útero	16.590	7,4%
	Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
	Glândula tireoide	11.950	5,4%
	Estômago	7.870	3,5%
	Ovário	6.650	3,0%
	Corpo do útero	6.540	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
	Sistema nervoso central	5.220	2,3%

FONTE: INCA (2019)

Na análise regional, o CC é o segundo mais incidente nas regiões Norte (21,20/100 mil), Nordeste (17,62/100 mil) e Centro-Oeste (15,92/100 mil). Já na Região Sul (17,48/100 mil), ocupa a quarta posição e, na Região Sudeste (12,01/100 mil), a quinta posição. Em termos de mortalidade, no Brasil, em 2017, ocorreram 6.385 óbitos por esta neoplasia, e a taxa de mortalidade bruta foi de 6,17/100 mil mulheres (INCA, 2019).

2.1.3 Cofatores

A infecção por HPVs oncogênicos é a causa necessária para o desenvolvimento do CC. No entanto, apesar da infecção por HPV ser o principal fator de risco, apenas algumas mulheres infectadas desenvolvem a doença, indicando que outros cofatores podem existir e, em conjunto com o HPV, influenciam o risco de progressão das lesões cervicais pré-câncer e conseqüentemente o desenvolvimento de CC (CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003).

O uso de contraceptivos orais por mais de 5 anos consecutivos, pode aumentar em até quatro vezes o risco do desenvolvimento CC em mulheres que são positivas para o HPV (MORENO et al., 2002). Mecanismos relacionados aos hormônios podem influenciar na progressão da infecção por HPV por promover a

integração do DNA viral no genoma do hospedeiro, e estimular a transcrição dos genes E6 e E7 envolvidos na carcinogênese (CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003).

A exposição ao tabagismo é um fator de risco bem documentado, levando a muitos tipos de câncer, como câncer de pulmão, esôfago, fígado e CC (RS; RAMAKRISHNAN, 2016). Carcinógenos do tabaco como a nicotina, podem danificar o DNA das células cervicais, além de afetar capacidade do hospedeiro de montar uma resposta imune local eficaz contra infecções virais, uma vez que foi demonstrado que o tabagismo pode reduzir o número de células de Langerhans e outros marcadores da função imune (CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003).

O risco de desenvolver CC também aumenta conforme o número de gestações. Há várias explicações biologicamente plausíveis para que isso ocorra como: mecanismos nutricionais, traumáticos, alterações hormonais induzidas pela gravidez (aumento dos níveis de estrogênio e progesterona) que podem modular a resposta imune ao HPV. Além disso, alterações hormonais e fisiológicas da gravidez, expõe a zona de transformação na ectocérvice por muitos anos, facilitando a exposição direta ao HPV (CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003).

A infecção por HPVs oncogênicos, como por exemplo HPV16 e HPV18, estão associados a um risco maior de desenvolvimento de lesões cervicais pré-câncer que comparados a outros tipos de HPVs (SCHIFFMAN et al., 2016).

2.1.4 Fisiopatologia

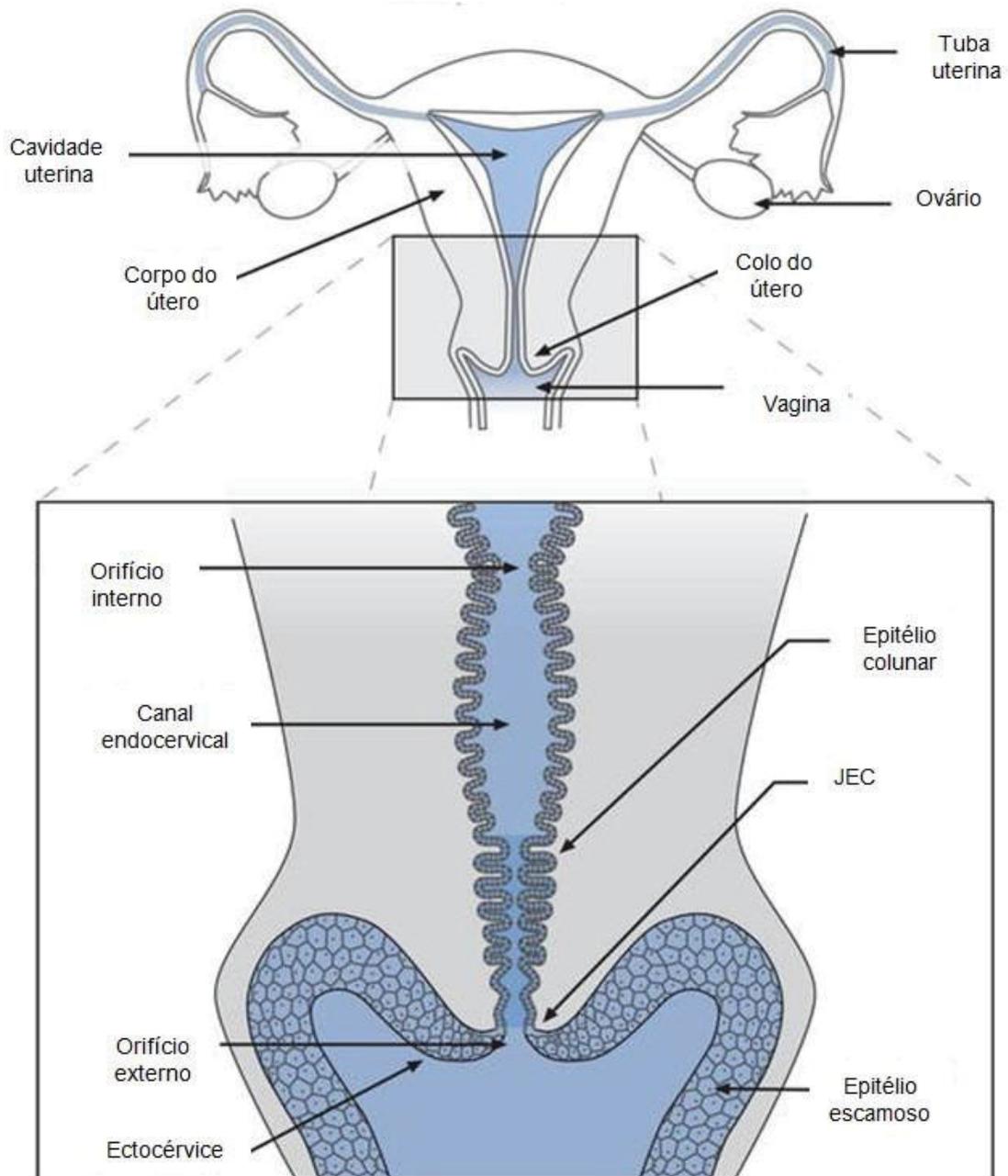
O colo uterino é uma estrutura fibromuscular que liga a cavidade uterina a vagina, e tem aproximadamente 4 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro. Dependendo da idade da mulher, paridade e estado hormonal, o colo do útero varia de tamanho e forma. Em mulheres que já pariram, o colo é volumoso e consideravelmente maior que em mulheres nulíparas, e na idade reprodutiva é maior que a de uma mulher na pós-menopausa (PRENDIVILLE; SANKARANARAYANAN, 2017)

O colo do útero apresenta duas regiões distintas: a endocérvice que conecta a cavidade uterina a vagina e se estende do orifício cervical interno ao externo, e a ectocérvice que se encontra na parte externa do orifício cervical, e, portanto, facilmente visível ao exame especular (FIGURA 5). Sua superfície é coberta por dois tipos de epitélios: a ectocérvice que fica em contato com a vagina é revestida

por epitélio escamoso estratificado não-queratinizado que contém glicogênio (FIGURA 5), a e endocérvice que é composta por epitélio colunar glandular produtor de muco (FIGURA 6) (PRENDIVILLE; SANKARANARAYANAN, 2017).

O local de encontro dos dois epitélios é denominado de junção escamocolunar (JEC), e devido a diferença da altura das células, essa região é bem definida e variável em relação ao orifício cervical externo durante a vida da mulher (PRENDIVILLE; SANKARANARAYANAN, 2017). Durante a infância, perimenarca, após a puberdade e início do período reprodutivo a JEC está localizada dentro do canal endocervical. Depois da puberdade e durante o período reprodutivo, os órgãos genitais femininos se desenvolvem sob a influência do estrógeno, e o colo uterino aumenta de tamanho e o canal endocervical se alonga, levando o epitélio colunar da parte inferior do canal endocervical próximo à ectocérvice. Nesta região, as células do epitélio colunar entram em contato com a acidez vaginal, e são destruídas (PRENDIVILLE; SANKARANARAYANAN, 2017).

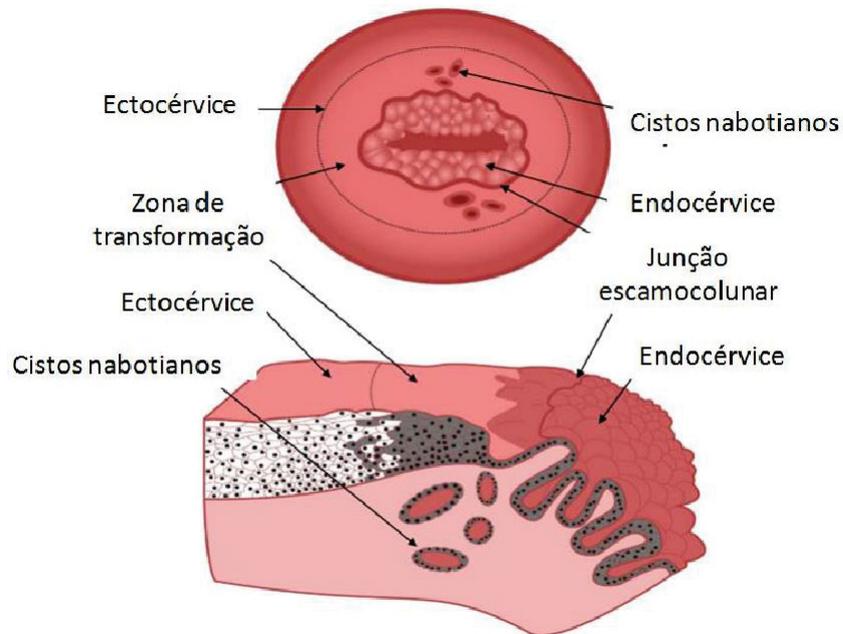
FIGURA 5 - ESTRUTURA E EPITÉLIOS DO COLO UTERINO



FONTE: Adaptado de Nuerse Key (2020)

A substituição fisiológica do epitélio colunar por um epitélio escamoso é denominada de metaplasia escamosa. Assim, células cilíndricas se transformam em células mais adaptadas (escamosas), dando origem a um novo epitélio, essa região de substituição é chamada de zona de transformação (ZT) (FIGURA 6), processo que cessa na menopausa (PRENDIVILLE; SANKARANARAYANAN, 2017).

FIGURA 6 - ESQUEMA DA ZONA DE TRANSFORMAÇÃO CERVICAL

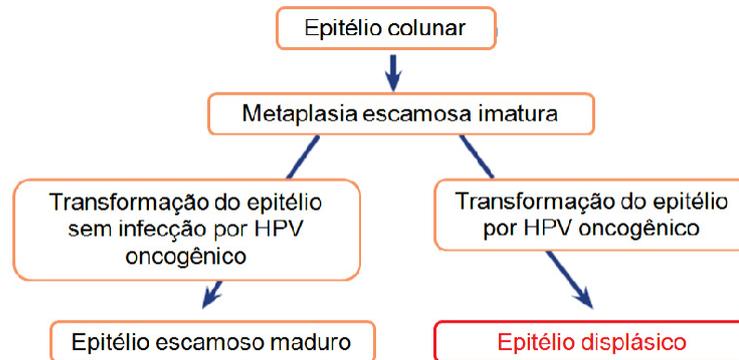


FONTE: Deng et al (2018)

NOTA: Figura superior: vista do colo do útero observada pelo ginecologista através do espéculo, mostrando ectocérvice, a ZT com cistos nabotianos e endocérvice. A figura inferior é uma seção transversal da ZT, mostrando o epitélio colunar da endocérvice e epitélio escamoso estratificado de ZT e da ectocérvice. Os cistos nabotianos se formam quando os ductos mucosos da endocérvice ficam ocluídos pelo crescimento excessivo do epitélio escamoso estratificado da ZT recém-formada. O sombreamento marrom ilustra células derivadas da reserva endocervical.

Os tipos oncogênicos do HPV têm uma afinidade por infectar as células basais escamosas imaturas da ZT, e transformá-las em células atípicas com anomalias nucleares e citoplasmáticas. A proliferação e expansão descontrolada dessas células atípicas podem levar à formação de um epitélio displásico anormal que pode regredir ao normal, persistir como displasia ou progredir para neoplasia invasiva depois de vários anos (FIGURA 7) (DENG et al., 2018)

FIGURA 7 - EFEITO DA INFECÇÃO POR HPV ONCOGÊNICO EM EPITÉLIOS ESCAMOSOS IMATUROS



FONTE: Adaptado de Prendiville; Sankaranarayanan (2017)

2.1.5 História natural do câncer cervical

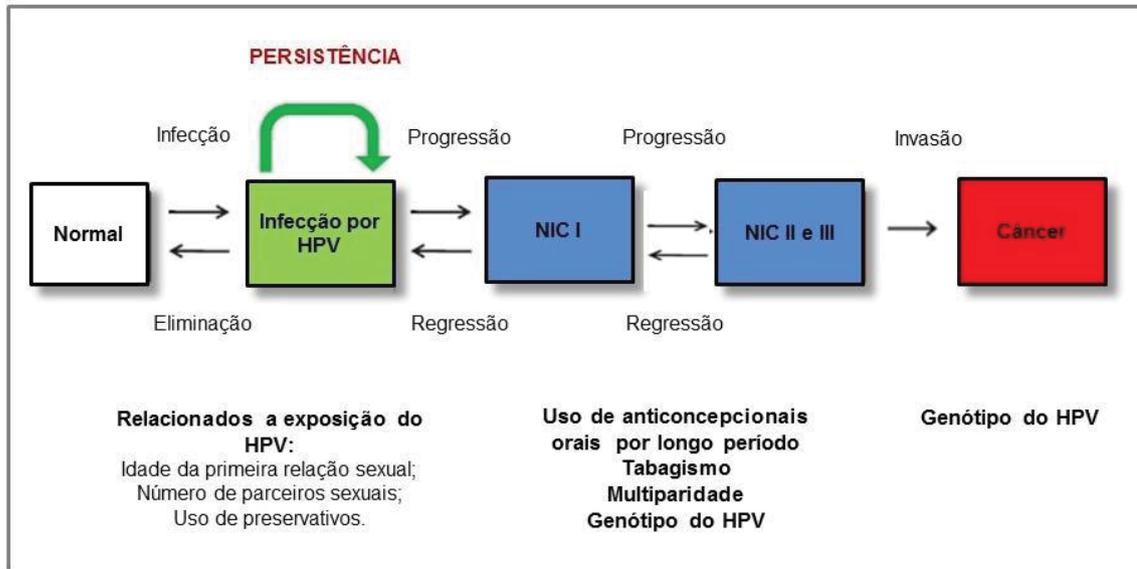
O CC surge através de uma série de etapas necessárias: infecção, persistência, desenvolvimento de lesões cervicais pré-câncer e por fim o CC (FIGURA 8) (SCHIFFMAN et al., 2016). O HPV está entre as infecções virais transmitidas sexualmente mais comuns no mundo, sendo que cerca de 80% dos casos de infecção serão eliminados em 2 anos como resultado de uma resposta imune mediada por células (DOORBAR et al., 2012). Da mesma forma, as lesões de baixo grau (NIC I) causadas por HPV, geralmente são transitórias, e se resolvem sem intervenção dentro de 1 a 2 anos (GRAVITT; WINER, 2017).

Apenas uma pequena parcela dessas infecções pode persistir e evoluir para CC. A incapacidade de desenvolver uma resposta imune eficaz para eliminar ou controlar a infecção, aliado a cofatores e o tipo oncogênico do HPV resultam em uma infecção persistente, aumentando a probabilidade de progressão das lesões cervicais pré-câncer (SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013).

As lesões cervicais pré-cancerosas levam cerca de aproximadamente 10 a 20 anos para que se tornem CC invasivo. Através do exame citopatológico, é possível diagnosticar tais lesões e tratá-las adequadamente, o que torna CC um tipo de câncer com alta possibilidade de prevenção (CASTLE et al., 2017). Se não tratadas, podem crescer e, eventualmente, atravessar o epitélio para borda do tecido conjuntivo formada pela membrana basal e tornar-se câncer invasivo, atingindo os vasos sanguíneos e linfáticos (TOTA et al., 2011).

Conhecer a história natural do CC é de extrema importância para que a saúde pública possa traçar estratégias de prevenção, rastreamento das lesões cervicais pré-câncer e tratamento do CC (GRAVITT; WINER, 2017).

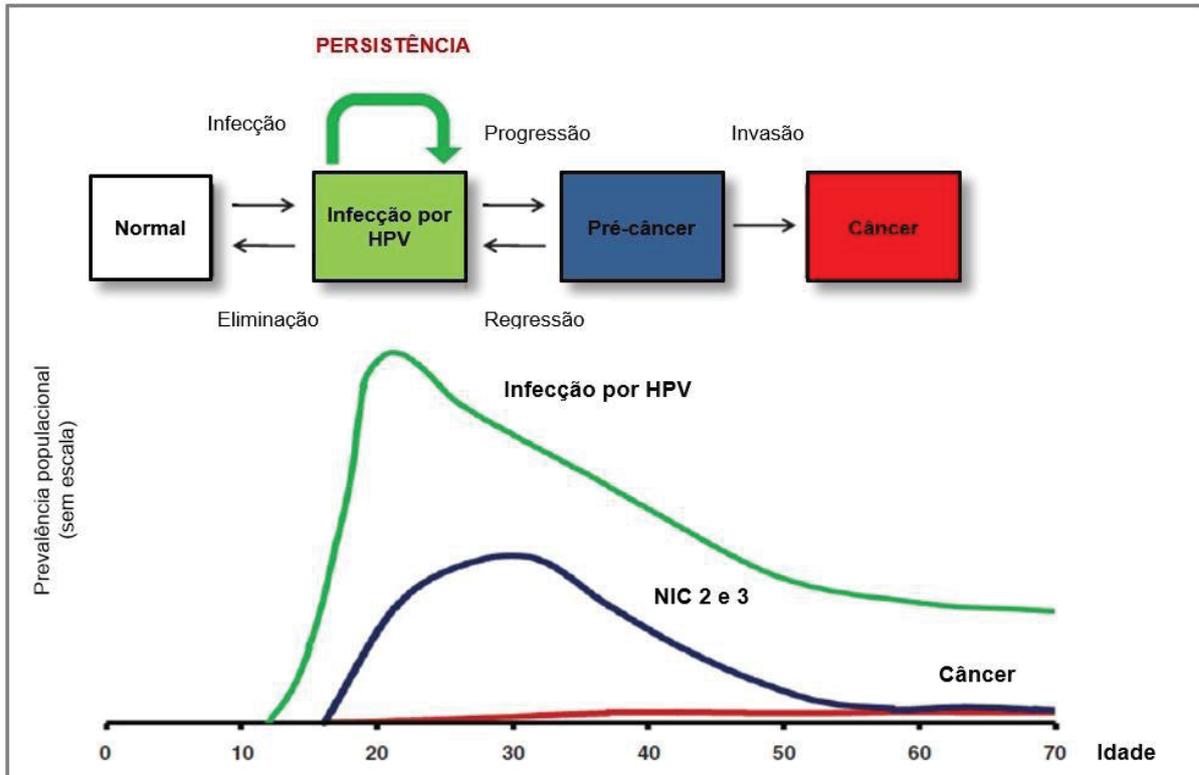
FIGURA 8 - HISTÓRIA NATURAL DO CÂNCER CERVICAL



FONTE: Adaptado de Schiffman; Wentzensen (2013).

Estudos epidemiológicos prospectivos junto com o avanço da biologia molecular realizados no final dos anos 90 e 2000 estabeleceram a via temporal de associação entre a exposição ao HPV de alto risco e o desenvolvimento de lesões precursoras e o CC (FIGURA 9) (BOSCH et al., 2002; GRAVITT; WINER, 2017). Os estágios da história natural do CC ocorrem em idades típicas no ciclo de vida da mulher, como altos índices de infecção por HPV na adolescência e início da idade adulta, e o pico de NIC II e III em torno de 25 a 35 anos e o ápice de CC de 45 a 60 anos (SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013).

FIGURA 9 - CRONOLOGIA E EVOLUÇÃO NATURAL DAS LESÕES PRÉ-CANCEROSAS E DO CÂNCER CERVICAL



FONTE: Adaptado de Schiffman; Wentzensen (2013).

NOTA: Figura mostrando o modelo de história natural e a prevalência de infecção por HPV, NIC II e NIC III e CC na população feminina.

2.2 SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento (SC) desempenha papel fundamental na imunidade inata, e é caracterizado principalmente por atuar na primeira linha de defesa contra patógenos, sendo um elo com a imunidade adaptativa (RICKLIN et al., 2010). Desde a sua descoberta como um componente bactericida que “complementa” o anticorpo, novas descobertas revelaram que o SC a percepção do SC mudou drasticamente: além de atuar na imunovigilância, agindo no reconhecimento, fagocitose e lise de patógenos e células tumorais, o SC também participa de processos diversos na homeostase como maturação de sinapses, angiogênese, eliminação imunocomplexos, regeneração tecidual e metabolismo lipídico (RICKLIN et al., 2010).

Essa versatilidade se torna menos surpreendente quando se considera que o SC representa um dos pilares mais antigos da imunidade, surgindo há cerca de 600-700 milhões de anos muito antes do aparecimento das imunoglobulinas, e coevoluiu

estritamente com vias filogeneticamente mais jovens da imunidade (ORIOLO SUNYER; ZARKADIS; LAMBRIS, 1998). Constituído por uma rede de mais de 50 glicoproteínas de plasma sanguíneo e de membrana, respondem rapidamente através de uma cascata sequencial de reações proteolíticas a sinais moleculares de estresse. As proteínas do SC são sintetizadas principalmente por hepatócitos, monócitos, macrófagos e enterócitos, bem como pelos adipócitos e células da glia como pró-enzimas inativas, ou zimogênios, o que permite que eles coexistam circulando no sangue e outros fluidos corporais (MERLE et al., 2015; TICHACZEK-GOSKA, 2012). Ao detectar um estímulo, um zimogênio inicial é ativado, sofrendo uma mudança conformacional e assim clivando o componente a jusante, ativando-o. Os zimógenos tornam-se estavelmente ativados após sua ligação com padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) ou com padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) nas células infectadas ou danificadas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). PAMPs são partes de carboidratos (principalmente hexoses) de glicoproteínas ou glicolipídios na superfície de microrganismos. Já os DAMPs são estruturas de carboidratos presentes na superfície de células apoptóticas, necróticas bem como células malignas (HOWARD; FARRAR; SACKS, 2018). A ativação em cascata do SC permite uma resposta rápida e amplificada que provoca uma série de funções efetoras incluindo fagocitose, inflamação, lise celular e orientação da resposta imune adaptativa (RICKLIN et al., 2010, MERLE et al., 2015). Como a ativação do SC leva a potenciais efeitos destrutivos, vários inibidores regulam ativamente esta cascata para proteger os tecidos do hospedeiro. Desta forma, um desempenho eficaz do SC depende de um fino equilíbrio entre os mecanismos de ativação e regulação. A ativação inadequada ou exacerbada do SC é causa importante de diversas doenças imuno-mediadas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; RICKLIN et al., 2010).

A ativação desta cascata pode ser desencadeada por três vias principais: Via Clássica (VC), Via das Lectinas (VL) e Via Alternativa (VA) (REIS et al., 2017). A VC é ativada quando o componente C1q se liga: ao domínio Fc de anticorpos da classe IgM e IgG ligados a antígenos (RICKLIN et al., 2010). Como parte do complexo C1 (C1qC1r2C1s2), uma vez que C1q se liga à sua superfície alvo, ocorre uma mudança conformacional nesta estrutura, induzindo à auto-ativação de C1r que por sua vez ativa C1s (MERLE et al., 2015). O C1s ativado, subsequentemente cliva C4 (em C4a e C4b) e C2 (em C2a e C2b). A clivagem de C4 expõe um tioéster reativo

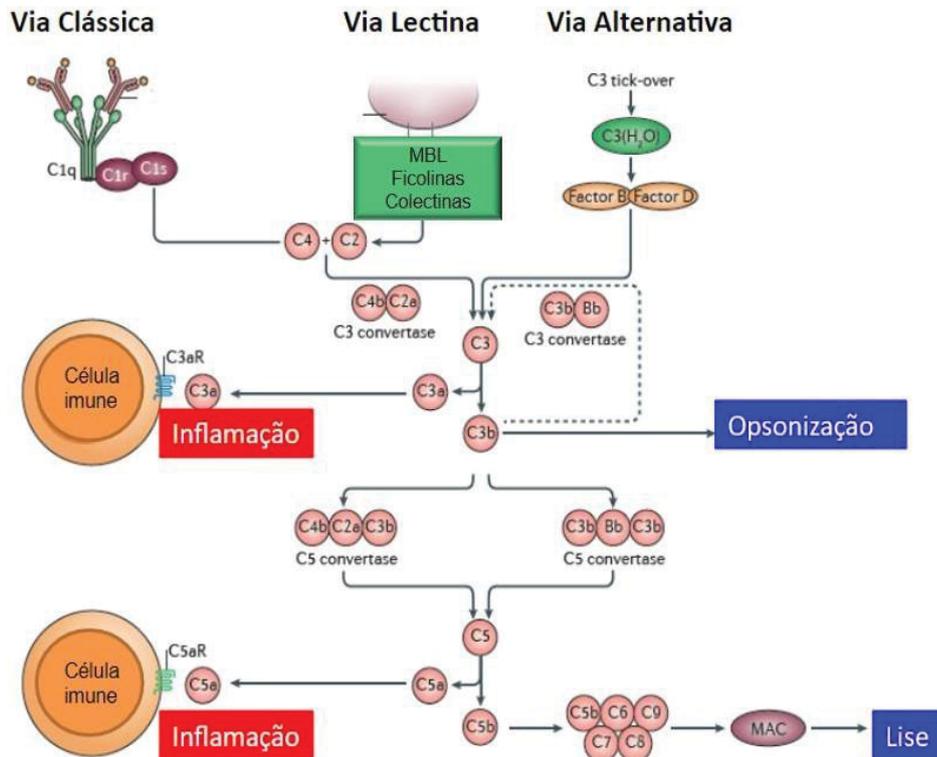
dentro do fragmento C4b que se liga à superfície do alvo, atuando como opsonina. O fragmento C2b ao ligar-se à C4b, forma a C3 convertase (C4b2b), capaz de clivar o componente C3 em C3a que é liberada no plasma, e C3b que se liga ao complexo C4bC2b, formando a C5 convertase (C4bC2bC3b) da VC (MERLE et al., 2015).

A VL é ativada através do reconhecimento da lectina de ligação à manose (MBL), ficolinas e coletinas a carboidratos presentes na superfície dos patógenos (MERLE et al., 2015). Após a ligação de MBL e as ficolinas, ativam às MASP, que são estruturalmente homólogas às proteases C1r e C1s da VC, e apresentam função similar: MASP-1 ativa MASP-2, que cliva C4 e C2, gerando a mesma C3 convertase (C4b2b) e os eventos subsequentes idênticos aos que ocorrem na VC (RICKLIN et al., 2010).

A VA é ativada continuamente pela hidrólise espontânea do componente C3 nativo circulante, processo conhecido como “*tick-over*” funcionando como uma sentinela, pronto para reagir às ameaças (RICKLIN et al., 2016). Após a hidrólise, o componente C3 sofre uma alteração conformacional em C3(H₂O) com um aspecto funcional similar ao de C3b, expondo uma ligação de tioéster reativo (TED) ligando-se a superfície do alvo, opsonizando-a. A protease do fator B (FB) se liga a C3H₂O e é clivada pelo fator D (FD), formando a C3 convertase da VA (C3H₂OBb) com capacidade de clivar outras moléculas de C3 em C3a e em C3b, amplificando a resposta (RICKLIN et al., 2016).

Assim, as três vias de ativação do SC convergem para a formação do complexo enzimático C3 convertase, que é responsável pela clivagem do componente C3 (RICKLIN et al., 2016). A clivagem de C3 desencadeia a formação dos fragmentos C3a, uma anafilatoxina que atua no recrutamento e ativação de células efectoras da resposta inflamatória e C3b, que se liga a superfície de patógenos e células tumorais sinalizando para fagocitose (RICKLIN et al., 2016). C3b também é componente da C5 convertase, um complexo enzimático que cliva C5 produzindo C5a, uma potente anafilatoxina, e C5b. A deposição do fragmento C5b na célula alvo contribui para a formação do complexo de ataque à membrana (MAC; C5b-9) levando a citólise (FIGURA 10) (BAYLY-JONES; BUBECK; DUNSTONE, 2017; KONDOS et al., 2010).

FIGURA 10 - PRINCIPAIS VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO



FONTE: Adaptado de Trouw; Pickering; Blom et al., (2017).

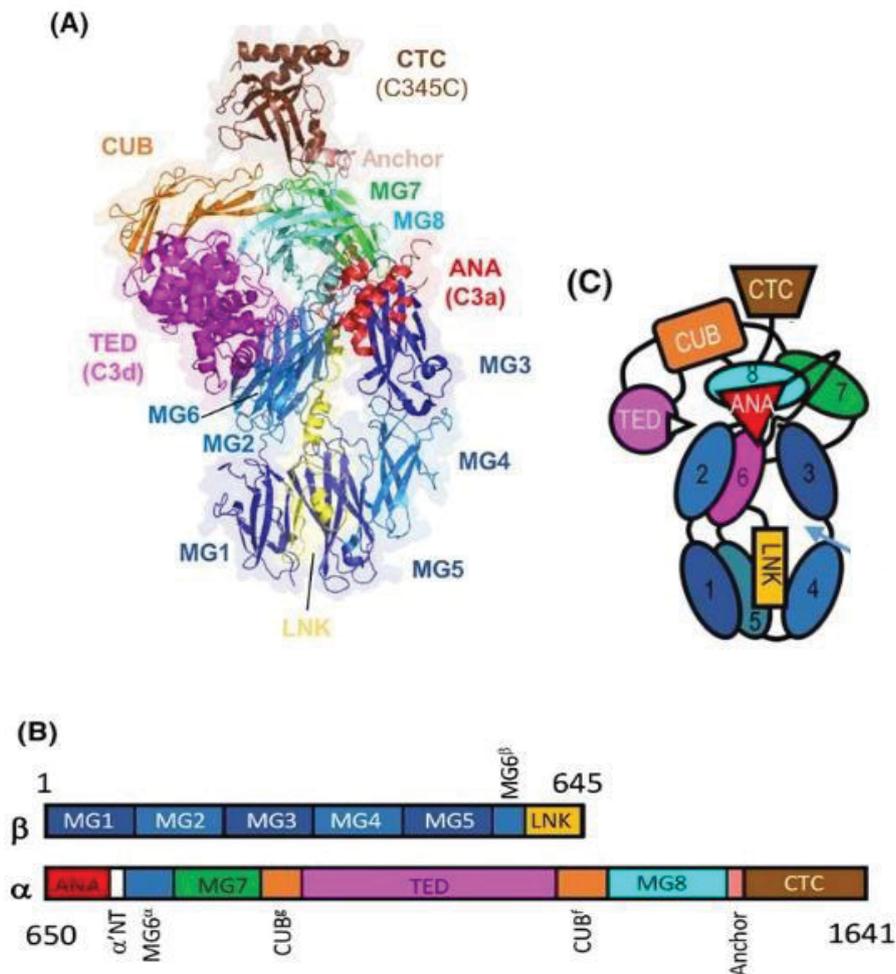
2.2.1 Componente C3 do Sistema Complemento

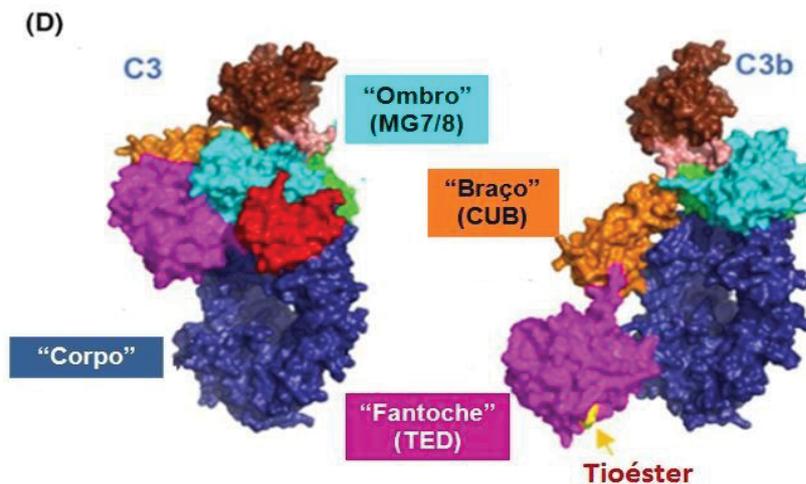
O componente C3 é uma glicoproteína de 185kDa que surgiu há mais de 700 milhões de anos e pertence à família α 2-macroglobulina (α 2M). Codificada pelo gene C3 no cromossomo 19 (locus p13.3), possui um arranjo estrutural notável formado por 13 domínios, sendo duas cadeias proteicas: a cadeia β (75 kDa) e a cadeia α (110 kDa), na qual cada uma possui seis domínios, e surpreendentemente o décimo terceiro domínio é compartilhado entre cadeias, formando uma ponte dissulfeto (RICKLIN et al., 2016).

Como reagente de fase aguda, o C3 precisa estar disponível instantaneamente, sua disponibilidade é alcançada por sua alta concentração plasmática de aproximadamente 1,2 mg/mL, tornando C3 uma das proteínas plasmáticas mais abundantes em circulação. Embora seja sintetizado principalmente por hepatócitos no fígado e distribuído por via intravascular, C3 também é produzido e secretado por várias células fornecendo assim uma fonte deste componente em diversos tecidos (RICKLIN et al., 2016).

O C3 nativo em circulação é inerte. Após a clivagem de C3 pela C3 convertase, fragmentos bioativos são liberados: C3a e C3b. O fragmento C3a é uma anafilatoxina que induz quimiotaxia, ativação celular e processos inflamatórios. O C3a se liga ao receptor C3aR acoplado à proteína G que é expressa pelas células mieloides, no entanto, as características funcionais do receptor, bem como a resposta ao C3a, são dependentes do tipo de célula (COULTHARD; WOODRUFF, 2015). A mudança conformacional de C3 para C3b revela vários sítios de ligação, como a exposição de um tioéster, porção que faz ligação covalente às superfícies alvo, tornando a transformação cinética de C3 para C3b a chave para a capacidade desse componente de atuar como um mediador eficiente da vigilância imunológica (FIGURA 11) (RICKLIN et al., 2016).

FIGURA 11 - ANATOMIA ESTRUTURAL DO COMPONENTE C3





FONTE: Ricklin et al., (2016).

NOTA: Em A: estrutura cristalina do C3 humano nativo, com os domínios coloridos individualmente. Em B: representação esquemática em barra linear dos arranjos dos domínios de C3. Em C: esquema das orientações relativas da estrutura cristalina. Em D: transformação estrutural de C3 em C3b após ativação do complemento. A clivagem de C3 nativo é acompanhada por rearranjos estruturais dos domínios, podendo ser descrita em analogia a um "marionetista" (figura D), composto por um corpo (MG1-6, LNK), ombro (MG7-8), pescoço (âncora), cabeça e braço (CUB), que segura um fantoche (TED). Em C3, o fantoche é sustentado até o ombro, enquanto é descartado em C3b, levando a um braço estendido e a um ombro torcido (RICKLIN et al., 2016).

2.2.2 Componente C5a do Sistema Complemento

O fragmento C5a é uma potente anafilotoxina que atua no recrutamento e ativação de células imunes, estimulando a produção de mediadores pró-inflamatórios como citocinas e quimiocinas (AJONA; ORTIZ-ESPINOSA; PIO, 2019). Essas atividades C5a são exercidas pela interação com este fragmento ao receptor C5aR (CD88) acoplado à proteína G presente em neutrófilos, eosinófilos, monócitos, células dendríticas e mastócitos (QUADROS; CUNHA, 2016).

C5a ainda atua no aumento da permeabilidade vascular e o fluxo sanguíneo no local da infecção, facilitando a eliminação de patógenos, e contração da musculatura lisa. C5a também se liga ao seu receptor C5aR em linfócitos T regulando sua ativação (AJONA; ORTIZ-ESPINOSA; PIO, 2019).

2.2.3 Polimorfismos do gene C3

Com o avanço da biologia molecular, tornou-se cada vez mais evidente que a variação genética individual é um componente essencial de respostas imunes em geral, o que contribui para suscetibilidade, evolução, e desfecho de doenças

infeciosas e autoimunes, além de câncer (OLIVEIRA et al., 2011). Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) são originados através de mutações pontuais no DNA, sendo amplamente distribuídos no genoma humano, podendo estar presentes em regiões codificadoras (éxons) e não codificadoras (íntrons e regiões intergênicas) (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

SNPs no gene C3 já foram correlacionados com diversas condições patológicas, e devido ao seu papel central na cascata, pode-se postular que polimorfismos no gene C3 têm importantes consequências biológicas (DELANGHE; SPEECKAERT; SPEECKAERT, 2014). Neste trabalho, três SNPs rs2230199, rs1047286 e rs2250656 descritos na literatura foram avaliados.

O SNP rs2250656 (A>G) foi associado com a síndrome metabólica (SM): pacientes homocigotos AA exibem perfil clássico da doença: triacilglicerol mais alto e menores concentrações de colesterol HDL, maior índice de massa corporal, obesidade abdominal, e eram menos sensíveis à insulina do que os homocigotos GG. Portadores de um alelo A também apresentaram estado inflamatório elevado, com altas concentrações do componente C3 e de PCR, tendo 2 vezes maior o risco de desenvolvimento de SM que GG homocigotos (PHILLIPS et al., 2009).

O SNP mais comum do gene C3 foi descrito por dois grupos independentes de cientistas, Weime e Demeulenaere (1967) e Alper e Propp (1968) denominado polimorfismo C3S/F ou p.R102G (rs2230199). Uma diferença na mobilidade na proteína do C3, observada em eletroforese em gel de agarose, levou à descoberta de duas variantes alotípicas: C3S (*Slow*=lento) e C3F (*Fast*=rápido), que são herdadas como características codominantes autossômicas (ALPER; PROPP, 1968; WEIME; DEMEULENAERE, 1967).

Como a eletroforese era um método demorado e exigia uma amostra de sangue fresco, Botto e colaboradores utilizaram a PCR seguida de RFLP para localizar a posição deste polimorfismo no genoma. Descobriram que na cadeia β da proteína C3 na posição 364 no éxon três, citosina é trocado por guanina (C>G) (FIGURA 12) resultando assim em um sítio de restrição polimórfico para a enzima *HhaI*. Ao nível proteico, carga positiva do resíduo arginina (Arg80) é substituída por glicina neutra (BOTTO et al., 1990).

Com o avanço da tecnologia, a análise tridimensional do C3 realizada por Janssen e colaboradores, foi possível localizar o polimorfismo rs2230199 no domínio

MG1 próximo ao domínio contendo o tioéster (TED) da proteína C3 (JANSSEN et al., 2006). Três aminoácidos carregados positivamente no domínio MG1 (Arg80, Arg72 e Lys82) formam a ligação tioéster com quatro aminoácidos negativos no domínio TED (Asp1007, Glu1008, Glu1010, Glu1013). O polimorfismo rs2230199, contendo glicina neutra (em vez de carga positiva), tem uma capacidade mais fraca de se ligar fator H (FH), o que pode prejudicar a regulação da VA. Além disso, o enfraquecimento das interações entre as superfícies do domínio MG1 e o domínio contendo o tioéster, poderia potencialmente influenciar a atividade do TED (HEURICH et al., 2011; YATES et al., 2007). Porém as diferenças funcionais entre as variantes C3 S/F ainda não são conclusivas (YATES et al., 2007).

O polimorfismo rs2230199 já foi associado com o aumento da ativação da VA do SC em doenças como degeneração macular relacionada à idade (DMRI) (YATES et al., 2007) e esclerose múltipla (ROOSTAEI et al., 2018). Também foi associado ao aumento de infecções, o que poderia desencadear diabetes tipo I (TÖRN et al., 2016) e em câncer de pulmão (SUADICANI; HEIN; GYNTELBERG, 2011).

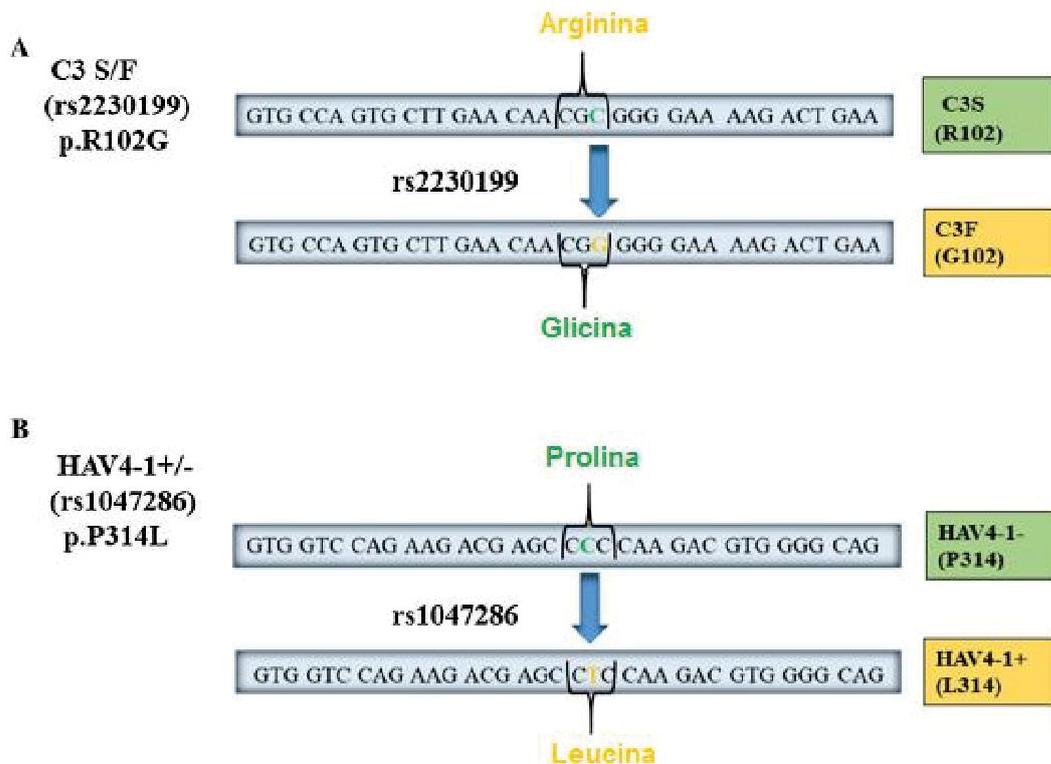
Outro polimorfismo comum do gene C3 foi descoberto por Koch e Behrendt em 1986 denominado HAV 4-1+/- (rs1047286, p.P314L) (KOCH; BEHRENDT, 1986). O polimorfismo rs1047286 está localizado no éxon 9 da cadeia β , onde uma única mudança de citosina por timina (C>T) causa uma substituição de prolina (HAV 4-1-, P314) por leucina (HAV 4-1+, L314) no nível da proteína. O rs1047286 está vinculado ao rs2230199. Estima-se que 98% dos portadores do alelo C3S são HAV 4-1- e apenas 2% são HAV 4-1+; em ao contrário, 90% dos portadores do alelo C3F são HAV 4-1+ e 10% é HAV 4-1- (BOTTO et al., 1990), Como o rs1047286 está localizado na MG3 domínio C3 (local de ligação do CFB), a variante polimórfica HAV 4-1+ tem maior capacidade de se ligar ao FB, componente crucial para a formação da C3 convertase da VA (ŁUKAWSKA; POLCYN-ADAMCZAK; NIEMIR, 2018).

O polimorfismo rs1047286 é identificado como um fator de risco genético à DMRI (YATES et al., 2007), e em pacientes com meningite bacteriana, homozigotos HAV 4-1+ tiveram um risco 4,5 vezes menor para contrair a doença em comparação com aqueles com o genótipo HAV 4-1+/+ ou HAV 4-1+/- (ADRIANI et al., 2013). Embora não haja dados publicados sobre o efeito de rs1047286 na função ou concentração do C3, indivíduos portadores deste polimorfismo parecem ter maior atividade da VA principalmente por estar em forte ligação de desequilíbrio com

rs2230199 em comparação com indivíduos que possuem alelos selvagens (ADRIANI et al., 2013).

Esses dados apoiam a hipótese de que variação genética no SC pode influenciar o limiar para sua ativação, muitas vezes referida como uma faca de dois gumes: um sistema ativado predispõe à inflamação crônica como em DMRI, enquanto um sistema menos prontamente ativo, embora protetor contra a inflamação, pode aumentar a suscetibilidade à infecção como a meningite bacteriana (ADRIANI et al., 2013; HEURICH et al., 2011). Isso pode ser ilustrado em um estudo de uma coorte de 347 holandeses imigrantes no Suriname no século 19 que perderam 60% do número logo após a chegada da febre amarela e tifoide. Os sobreviventes dessas epidemias apresentaram maior frequência de alelo C3F em comparação com a população parental ($p = 0,00001$), evidenciando que uma forte pressão seletiva diante da infecção (DE VRIES et al., 1979).

FIGURA 12 - POLIMORFISMOS rs2230199 E rs1047286



FONTE: Adaptado de Łukawska; Polcyn-Adamczak; Niemir (2018).

NOTA: A- a mudança de um único nucleotídeo (citosina para guanina) na posição 364 em o éxon 3 do gene C3 causa uma substituição de uma arginina carregada positivamente em C3S por uma glicina neutra em C3F. B- a mudança de um único nucleotídeo (citosina para timina) na posição 314 em o éxon 9 no gene C3 causa uma substituição de prolina em HAV 4-1- por leucina em HAV 4-1+.

Apesar dos polimorfismos descritos acima já terem sido associadas a diversas doenças, ainda não foram analisados em CC.

2.3 SISTEMA COMPLEMENTO NO CÂNCER

A transformação neoplásica é um processo multifatorial de várias etapas com alterações genéticas e epigenéticas, e com base na imunovigilância, essas alterações são reconhecidas por mecanismos imunológicos inatos e adaptativos eliminando muitos, se não a maioria dos tumores (PIO; AJONA; LAMBRIS, 2013; REIS et al., 2017). O SC é capaz de reconhecer elementos não-próprios, e mudanças nas células tumorais as quais se tornam alvos para o reconhecimento do SC, um exemplo disso, é que fragmentos de ativação do SC são comumente detectados em diversos tipos de tecidos tumorais (REIS et al., 2017)

Os componentes do SC são produzidos principalmente pelo fígado, mas vale destacar que células tumorais e estromais também têm a capacidade de produzir proteínas do SC. Assim, sua concentração dentro do tumor é devido à contribuição do compartimento sistêmico e da produção local pelos diferentes tipos de células (REVEL et al., 2020).

Atualmente os dados sobre SC e câncer indicam um papel ambivalente, com estudos apontando função protetiva na resposta do hospedeiro, enquanto outros destacam sua atuação na promoção tumoral. Esse duplo papel não é surpreendente, tendo em vista o fato de que o SC contribui para uma infinidade de processos imunológicos e inflamatórios, cada um deles tendo um único contexto dependente resultados em diferentes modelos de tumor (BANDINI et al., 2013).

Os componentes do SC podem promover uma resposta imune antitumoral através da citólise e modulação da resposta imune inata (RICKLIN et al., 2010; REIS et al., 2017). Fragmentos de ativação do SC como C3b, iC3b e C3dg estão associados a antígenos se ligam aos receptores do SC presentes em células fagocíticas, tais como: CR3 e CR4, presentes nas células fagocíticas, induzindo fagocitose e modulação da função de células apresentadoras de antígenos (RICKLIN et al., 2010). Por outro lado, a ativação desequilibrada do SC no microambiente tumoral contribui para imunossupressão de células T locais e inflamação crônica, promovendo a evasão imunológica do tumor, crescimento e metástase (REIS et al., 2017, MARKIEWSKI et al., 2008, CORRALES et al., 2012).

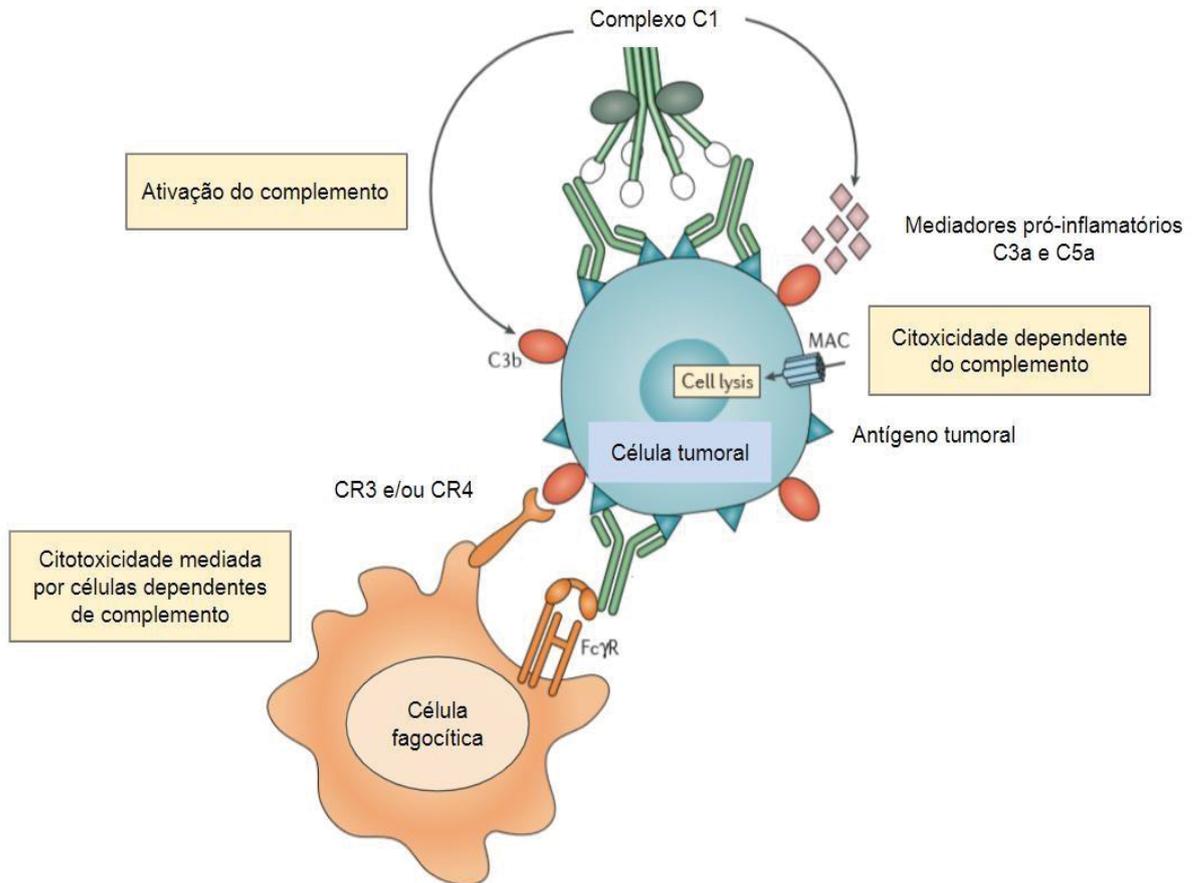
Dado que o desenvolvimento do câncer é fortemente influenciado por respostas imunes, pode-se supor que o SC é um fator de ligação que determina a qualidade e a magnitude da resposta imune antitumoral local (REIS et al., 2017).

2.3.1 Sistema complemento e imunoterapia no câncer

O desenvolvimento de terapias com anticorpo monoclonal (mAb) tem se mostrado promissor no tratamento anticâncer por atuar diretamente em antígenos expressos em células tumorais, melhorando assim a especificidade da terapia. O direcionamento terapêutico de mAbs desencadeiam a ativação do SC através da via clássica pela ligação de C1q à porção Fc desses anticorpos ligados a antígenos das células tumorais, e como consequência da ativação da cascata, fragmentos de C3 (C3b, iC3b e C3dg) atuam na opsonização nessas células e a geração de potentes mediadores inflamatórios (C3a e C5a) que recrutam e ativam células imunológicas com propriedades fagocíticas (neutrófilos e macrófagos). A ativação a jusante das etapas finais do complemento resulta na eliminação direta das células tumorais pela citotoxicidade dependente do complemento (CDC) realizado pelo MAC (FIGURA 14) (AFSHAR-KHARGHAN, 2017; KOURTZELIS; RAFAIL, 2016; REIS et al., 2018; REVEL et al., 2020).

No entanto, uma variedade de células tumorais especialmente em tumores sólidos, desenvolveram diversos mecanismos pelos quais eles podem limitar o CDC em suas superfícies, como a superexpressão de proteínas reguladoras do complemento ligadas à membrana (mCRPs) conhecidas como CD46, CD55 e CD59 (GELLER; YAN, 2019). O regulador CD55 ou fator de aceleração de decaimento (DAF) aumenta a dissociação das C3 e C5 convertases, reduzindo a formação de anafilatoxinas (C3a, C4a, C5a) e de opsoninas (C3c e iC3b), e evitando formação de MAC. O regulador CD46 ou proteína cofator de membrana (MCP) funciona como um cofator para o Fator I que degrada C3b e C4b (em iC3b e iC4b, respectivamente) prevenindo a formação de novas convertases. O regulador CD59 impede a inserção de C9 no complexo C5b-8 interferindo diretamente formação do poro inibindo da formação de MAC (FIGURA 15). Várias estratégias estão sendo desenvolvidas para superar este obstáculo em imunoterapia baseada em mAb (AFSHAR-KHARGHAN, 2017; GELLER; YAN, 2019; KOURTZELIS; RAFAIL, 2016; REIS et al., 2018; REVEL et al., 2020)

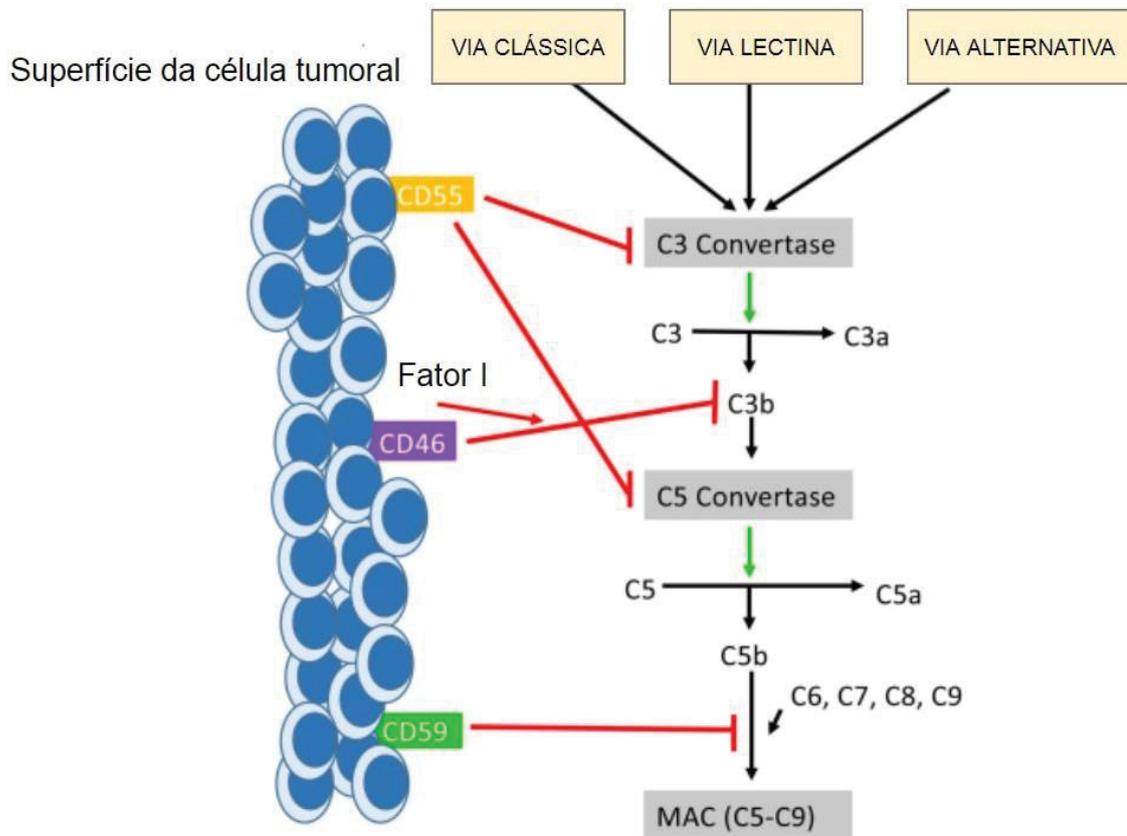
FIGURA 13 - CITÓLISE TUMORAL MEDIADA PELO SISTEMA COMPLEMENTO NO CONTEXTO mAb



Fonte: Adaptada de Reis et al, (2017)

Nota: A anafilatoxina C5a é conhecida por regular positivamente ativação dos receptores $Fc\gamma$ ($Fc\gamma$ Rs) nas células fagocíticas, preparando-as para fagocitose e aumentando a magnitude da resposta citolítica do tumor. Os fragmentos derivados do C3 em células tumorais ligam-se a CR3 ou CR4 receptores em fagócitos, aumentando assim a captura fagocítica dependente de $Fc\gamma$ R de células tumorais opsonizadas.

FIGURA 14 - PROTEÍNAS REGULADORAS DO SISTEMA COMPLEMENTO



FONTE: Geller et al., (2019)

NOTA: Os reguladores do CD55, CD46 e CD59 exercem controle sobre todas as três vias de ativação do complemento.

2.3.2 Componentes C3 e C5a no câncer

O componente C3 do SC já foi relacionado tanto à promoção quanto à proteção contra tumores (REIS et al., 2017; REVEL et al., 2020). Em camundongos com câncer de pulmão, foi observada deposição de C3 na superfície das células cancerosas e também níveis elevados de C3a no plasma, sendo que o crescimento de tumores primários e metástases foi fortemente inibido em camundongos deficientes de C3 ou pelo inibidor do receptor C3aR (KWAK et al., 2017). Em modelo de camundongo com câncer de ovário, a deficiência de C3 ou C5aR também inibiu o crescimento tumoral (NUNEZ-CRUZ et al., 2012). Além disso, A ativação e deposição de C3 em tecido gástrico no microambiente tumoral foi correlacionado com a inflamação local e invasão de células tumorais (YUAN et al., 2020).

Em camundongos deficientes do componente C3, mas que expressaram o oncogene *Her2/neu* em adenocarcinoma de mama apresentaram multiplicidade

tumoral, estimulação do crescimento tumoral, bem como disseminação metastática de células cancerosas para os pulmões (BANDINI et al., 2013).

Por outro lado, Lin et al. relataram um papel antitumoral do C3 em câncer de pulmão. Biópsias de câncer de pulmão expressam C3 nas áreas estromal e peritumoral, indicando que o SC pode ser sintetizado por células estromais e inflamatórias nessas áreas (LIN et al., 2014). Altos níveis de C3 foram correlacionados a maiores taxas de sobrevida, enquanto que baixos níveis deste componente foram associados a um mau prognóstico (LIN et al., 2014). Além disso, o C3 desempenhou papéis cruciais na mediação de respostas imunes contra o tumor em um modelo de terapia fotodinâmica de glioma de camundongo (LI et al., 2011). Ainda, deposição aumentada do C3 em linhagem de células tumorais renais humanas foi acompanhada por um aumento na lise destas células (BLOK et al., 1998).

Corrales et al, verificaram que células de câncer de pulmão *in vitro* foram capazes de gerar C5a por vias não convencionais de ativação do SC, o que pode explicar o aumento dos níveis plasmáticos desta proteína em pacientes câncer de pulmão de células não pequenas. Surpreendentemente, a capacidade das células tumorais de produzir C5a ocorreu na ausência de fonte exógena dos componentes do SC (isto é, soro) (CORRALES et al., 2012). Além disso, o bloqueio farmacológico de C5aR diminuiu a população de MDSCs no baço de camundongos com câncer de pulmão, pois o bloqueio regulou negativamente a expressão de moléculas imunossupressoras como ARG1, IL-10, IL-6, CTLA-4, LAG3 e PDL1, maioria destes mediadores da atividade de células T reguladoras (CORRALES et al., 2012). Por outro lado, Gunn et al, demonstraram que o papel de C5a é dependente de sua concentração, na qual altos níveis de C5a estimulam o crescimento tumoral com diminuição significativa da infiltração de células T CD4+ e CD8+, enquanto baixos níveis de C5a no microambiente tumoral diminuem a progressão tumoral (GUNN et al., 2015)

Já em relação ao SC em lesões cervicais pré-câncer e CC, níveis séricos elevados de MASP-2, MASP-1 e MAp-19 foram associados com progressão do CC e pior prognóstico da doença, porém em outro estudo realizado pelo mesmo grupo, não conseguiram estabelecer a relação entre a concentração sérica de MBL e a evolução de lesões cervicais pré-câncer e CC (MAESTRI et al., 2017, 2018). Níveis elevados do C3 foram observados no soro de pacientes NIC III positivas para HPV-

16 (CANALES et al., 2014) e em plasma de pacientes com CC (JEONG et al., 2008) indicando que C3 pode ser um biomarcador importante nessas condições.

Markiewski et al. demonstrou em modelo de camundongo com CC que a ativação do SC, caracterizada pela deposição de fragmentos de C3 no tecido tumoral, bem como a sinalização de C5a, foram requeridos para o recrutamento eficiente de células supressoras de origem mielóide (MDSC), as quais suprimem a resposta antitumoral mediada por células T CD8+, através da geração de espécies de nitrogênio e oxigênio reativos altamente supressivos, favorecendo o crescimento do tumor (MARKIEWSKI et al., 2008). Além disso, a deficiência ou bloqueio farmacológico de C5aR1 prejudicou o crescimento do tumor (MARKIEWSKI et al., 2008). Em contraste, no mesmo modelo tumoral, a liberação local de C5a no estroma e na vasculatura permitiu o extravasamento eficiente de células T, levando a um controle eficaz do tumor, durante imunoterapia com células T (FACCIABENE et al., 2017).

Compreender o papel do SC na imunologia e na genética das lesões cervicais pré-câncer e no CC são de grande importância para fundamentar ações de rastreio bem como no desenvolvimento de imuno terapêuticos ou imunomoduladores visando uma melhorando na qualidade de vida das pacientes. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo investigar a associação dos componentes séricos C3 e C5a do SC, bem como os polimorfismos do gene C3 (rs2250656, rs2230199 e rs1047286) como potenciais marcadores de lesões cervicais pré-câncer e câncer cervical.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Erasto Gaertner (Curitiba, PR, Brasil), (CAAE: 62542616.7.0000.0098, aprovado em: 07-05-2017) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná (CAAE: 02385318.4.3001.0101, aprovado em 22-02-2019) (ANEXO 1). Todas as pacientes incluídas no estudo aceitaram participar da pesquisa e assinaram o TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE 2).

3.1.1 Classificação do tipo de pesquisa

Trata-se de um estudo observacional transversal.

3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA

3.1.2 Pacientes

Fazem parte deste estudo 86 pacientes diagnosticadas com CC (63 com carcinoma de células escamosas (CCE), 15 adenocarcinoma, 8 sem classificação histopatológica disponível) e 29 com lesões cervicais pré-invasivas (15 com NIC I e 14 com NIC II), sendo que todos os casos foram diagnosticados com base no resultado do exame citológico associado a colposcopia cervical, e o grupo NIC II e CC foram ainda confirmados com exame histopatológico. As participantes com CC e NIC foram recrutadas no ambulatório de ginecologia do Hospital Erasto Gaertner (Curitiba, PR, Brasil) no período de julho de 2017 a novembro de 2017, e março de 2019 a março de 2020. Os critérios de inclusão das pacientes foram: idade acima de 18 anos, e com diagnóstico de NIC ou CC. Os critérios de exclusão das pacientes foram: idade abaixo de 18 anos, gravidez, HIV positivo, doenças autoimunes, uso de medicamentos corticoides e transfusão sanguínea nos últimos 60 dias. Dados clínicos, sociodemográficos e características da saúde reprodutiva foram obtidos através de consulta à prontuário eletrônico e entrevista por questionário padronizado (TABELA 1). Amostras de sangue periférico foram coletadas de todas as

participantes, para posterior análise genética e de marcadores sorológicos, e armazenadas a -80 °C.

3.1.3 Grupo Controle

O grupo controle foi constituído por 78 mulheres com citologia negativa para NIC e CC, recrutadas pela Unidade de Saúde Nossa Senhora Aparecida (Curitiba, PR, Brasil) no período de março de 2019 a março de 2020. Os critérios de inclusão dos controles foram: mulheres com 18 anos ou mais, com citologia negativa para NIC e CC, sem queixas clínicas, autodeclaradas sem doenças inflamatórias crônicas. Os critérios de exclusão foram os mesmos aplicados às pacientes com NIC ou CC. No grupo controle, 19 mulheres apresentaram teste de citologia cervical normal, sem indicação de inflamação no colo do útero e 59 com teste de citologia cervical normal e com cervicite. Também foram coletados dados clínicos, sociodemográficos e características da saúde (TABELA 1) bem como a coleta de amostras de sangue, para posterior análise genética e de marcadores sorológicos, e armazenadas a -80 °C.

TABELA 1 - DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E CARACTERÍSTICAS DA SAÚDE REPRODUTIVA DO GRUPO DE CONTROLE E CC

Variável	Controle n=78	%	CC n=86	%	p
Idade					0,0006
20-35	25	32,05	11	12,79	
31-40	14	17,95	25	29,07	
41-50	25	32,05	17	19,77	
>51	14	17,95	33	38,37	
Ancestralidade					0,073
Eurodescendente	61	76,9	75	87,2	
Afrodescendente	13	16,7	11	12,8	
Indígena	4	6,4	0	0,0	
^a Escolaridade					0,025
Ensino fundamental	36	46,2	55	64,0	
Ensino médio	27	34,6	24	27,9	

Ensino superior	12	15,4	6	7,0	
Nenhum estudo	0	0,0	1	1,2	
Não informado	3	3,8	0	0,0	
Estado civil					0,006
Solteira	18	23,1	6	7,0	
Casada/União estável	47	60,3	57	66,3	
Divorciada	6	7,7	11	12,8	
Viúva	3	3,8	11	12,8	
Dados ausentes	4	5,1	1	1,2	
Tabagismo					< 0,0001
Tabagista	11	14,1	17	19,8	
Ex-tabagista	3	3,8	23	27,6	
Não tabagista	64	82,1	46	53,5	
Idade da primeira relação sexual (anos)					0,490
≤18	64	82,1	65	75,6	
19-34	13	16,7	18	20,9	
Não informado	1	1,3	3	3,5	
Número de gestações					
0	14	17,9	2	2,3	0,006
1	10	12,8	15	17,4	
2	19	24,4	18	20,9	
≥3	35	44,9	51	59,3	
Uso de preservativo (últimos 12 meses)					0,864
Sim	23	29,5	24	27,9	
Não	55	70,5	61	70,9	
Uso de anticoncepcional oral					
Sim	23	29,5	55	64,0	< 0,0001
Não	55	70,5	29	33,7	
Não informado	0	0,0	2	2,3	

Dados das amostras utilizados na análise dos polimorfismos do gene C3. Valor de $p < 0,05$ são mostrados em negrito. *Baseado no sistema educacional brasileiro.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada usando o método de salting-out de acordo com Cardozo (CARDOZO et al., 2009). As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, USA) e diluídas a 50 ng/ul e armazenadas a -20°C até a amplificação.

3.2.2 Seleção de SNPs de interesse do gene C3 e desenho de primers

Foram selecionados três SNPs do gene C3 através do banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Estes foram escolhidos com base na associação com doenças, potencial de alteração na atividade proteica do C3 e frequência populacional. Os SNPs escolhidos apresentam frequência alélica mínima (Maf) igual ou superior a 10% da população europeia Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) (TABELA 2).

TABELA 2 - FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS SNPS DO GENE C3 SELECIONADOS

dbSNP	População Europeia (%)	População africana (%)	Localização	Aminoácido	Alótipo
rs2250656	A 70% G 30%	A 82% G 18%	Intron 2	n.a	n.a
rs2230199	C 83% G 17%	C 97% G 03%	Exon 3	p.R102G	C3S/C3F
rs1047286	C 76% T 24%	C 99% T 01%	Exon 9	p.P314L	HAV 4-1-/HAV 4-1+
Controle	n.a	n.a	Exon 10 MBL	n.a	n.a

Legenda: dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism Database; bp: par de bases; n.a: não se aplica;
Fonte: *Ensembl*

O gene *MBL* foi escolhido como controle endógeno da reação pois seu tamanho (1059pb) não confronta com o dos produtos do gene C3, que apresentam 182pb e 75pb.

Para os SNPs selecionados foram desenhados iniciadores sequência específicos com uma média de 18 a 23 nucleotídeos complementares a uma região

específica do gene, fazendo com que o último nucleotídeo do iniciador coincida com a variação a ser investigada. Utilizando a ferramenta NCBI/Primer-Blast, foram projetados os iniciadores diretos e reversos de acordo com a sequência NT-019501 do cromossomo 3 (TABELA 3).

TABELA 3 - SEQUÊNCIA DOS INICIADORES E TAMANHO DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS

dbSNP	Localização	Iniciador	Sequência 5'- 3'	Produto Amplificado
rs2250656	Intron 2	IVS2_-111A_For	AAAACGGCCACCTCGGA	182 pb
rs2230199	Exon 3	IVS2_-111G_For Exo3_+37G_Rev	AAAACGGCCACCTCGGG CGGTCACGAACTTGTTCGG	182 pb
rs1047286	Exon 9	Exo3_+37C_Rev Exo9_+65C_For	CGGTCACGAACTTGTTCGC GACGGGGTGCAGAACCC	752pb
Controle	Exon 10 MBL	Exo9_+65T_For Exo10_Rev	GACGGGGTGCAGAACCT CAAAGGGCATTCTGGTTTGA ATGGGGCTAGGCTGCTGAG CCAACACGTACCTGGTCCC	1059pb

Fonte: *Ensembl*.

Legenda: pb: pares de base.

3.2.3 Reação em cadeia da polimerase com iniciadores de sequência específica (PCR-SSP)

A reação de PCR-SSP multiplex (Polymerase Chain Reaction/Sequence Specific Primers) abrangendo todos os SNPs de interesse foi padronizada e utilizada para a genotipagem de pacientes e controles. Essa técnica é muito vantajosa, pois é possível combinar todos os marcadores a serem utilizados no estudo em um pequeno número de PCRs. Esta técnica reduz tempo de bancada e custos com reagentes, além de utilizar uma quantidade menor de DNA. Para obter resultados reproduzíveis, todas as etapas foram cuidadosamente padronizadas.

O SNP rs2250656 foi avaliado através dos primers IVS2_-111For_A/G que foram conjugados com o iniciador reverso do SNP rs2230199 Exo3_+37_Rev_G/C para gerar um fragmento de 182pb. A condição da PCR foi a seguinte: 0,2 µM de cada primer, 1X de tampão PCR CoralLoad (Qiagen, Hilden, Alemanha), 0,5 mM MgCl₂ (Qiagen, Hilden, Alemanha), 1,5% de glicerol, 0,2 mM desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,03 U/µL de Taq polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 20 ng/ul de DNA e água ultrapura para 15 µl.

O SNP rs1047286 foi avaliado através dos primers Exo9_+65_For_C/T que foram conjugados com o primer do Exo10_Rev para gerar um fragmento de 752pb.

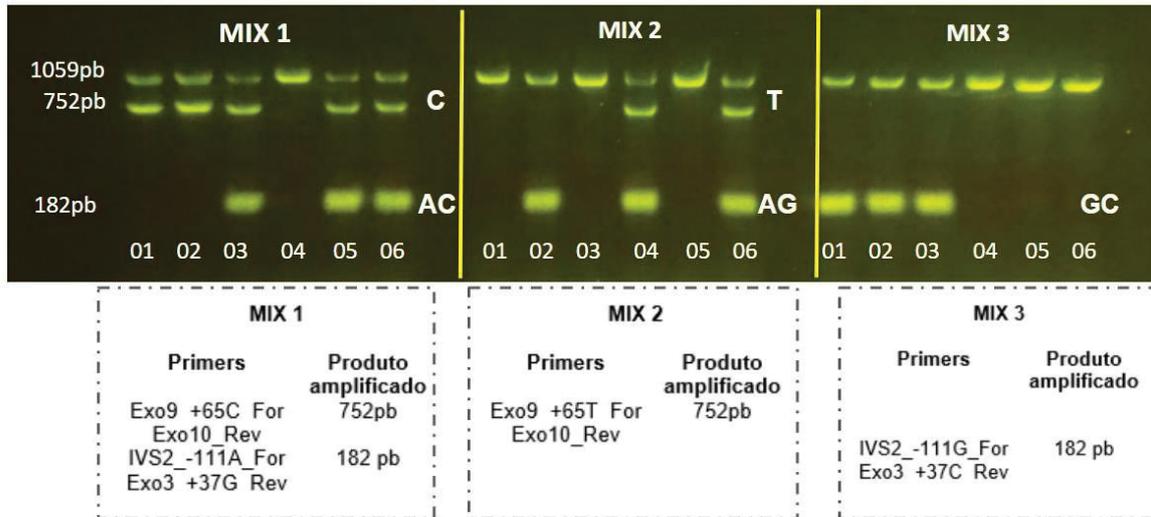
A condição da PCR foi a seguinte: 0,3 μM de cada primer da região do exon9 e 0,2 μM de cada primer da região do exon 10, 1X de tampão PCR CoralLoad (Qiagen, Hilden, Alemanha), 0,5 mM MgCl_2 (Qiagen, Hilden, Alemanha), 1,5% de glicerol, 0,2 mM desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,03 U/ μL de Taq polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 20 ng/ μL de DNA e água ultrapura para 15 μL .

O programa de ciclos no termociclador consiste na repetição de 3 passos por 35 vezes: primeiramente há um aquecimento à 94°C (período de desnaturação) por 3 minutos (apenas no primeiro ciclo) na sequência ocorre o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores nos 45 segundos subsequentes à 94°C; para a extensão do molde pela Taq DNA polimerase, a temperatura é diminuída até 64°C, a qual permanece constante por 30 segundos; a etapa de extensão ocorre em 72°C por 1 minuto.

3.2.4 Corrida eletroforética

Os produtos resultantes das reações de amplificação foram submetidos a corridas eletroforéticas em gel de agarose a 1,0% contendo 5 μL de corante fluorescente *Sybr Safe* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para cada 1,5g de agarose em 100 mL de solução tampão. Os dados resultantes das reações foram obtidos com base nos padrões eletroforéticos dos fragmentos amplificados, observados em transiluminador sob luz ultravioleta. Cada reação foi acompanhada por controles negativos, e amostras de DNA previamente genotipadas. Os padrões eletroforéticos da PCR-SSP multiplex para SNPs do gene C3 podem ser observados na FIGURA 16, e a interpretação dos resultados e atribuição de genótipos no TABELA 4.

FIGURA 15 - PCR-SSP MULTIPLEX PARA SNPS DO GENE C3 – PADRÃO ELETROFORÉTICO



FONTE: Os autores (2022).

LEGENDA: pb= pares de bases. A= adenina. T= timina. C= citosina. G= guanina.

Nota: Amplificação dos fragmentos esperados nas combinações conforme seus SNPs. Como controle endógeno foram utilizados iniciadores para fragmento específico do MBL 1059pb, amplificando em todos os indivíduos.

TABELA 4 - INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO E ATRIBUIÇÃO DE GENÓTIPO

Amostra	Intron 2 (rs2250656; 182pb)	Exon 3 (rs2230199; 182pb)	Exon 9 (rs1047286; 752pb)
01	GG	CC	CC
02	AG	CG	CC
03	AG	CC	CC
04	AA	GG	TT
05	AA	CC	CC
06	AA	CG	CT

FONTE: Os autores (2022).

3.2.5 Dosagem dos componentes C3 e C5a do complemento

Os níveis séricos do C3 foram avaliados em 40 pacientes, sendo 29 com lesões cervicais pré-invasivas (NIC I = 15, NIC II = 14) e 11 com CC e, em 66 controles, sendo 19 mulheres com teste de citologia cervical normal (controle saudável) e 47 com teste de citologia cervical normal e com cervicite (grupo cervicite). O grupo cervicite foi utilizado como um grupo de comparação para as avaliações de dosagens séricas do SC, visto que a inflamação devido a cervicite poderia influenciar nas quantificações realizadas (LAUSEN et al., 2018; LEWIS; RAM, 2020). Os grupos de análise foram pareados por idade (média em controles saudáveis: 42,5 anos; grupo cervicite: 38,0 anos; CC: 37,5 anos; NIC I/II: 35,6 anos; $p > 0,05$) e ancestralidade (Euro-descendentes em controles saudáveis: 84%, grupo

cervicite: 81%, CC: 64%, NIC I/II 76%; $p>0,05$). A dosagem de C3 foi realizada utilizando o método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA ou Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) desenvolvida *in house* (GRACIA et al., 2021). Para isso, placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 μ l de anticorpo policlonal anti-C3 humano feito em cabra (3.4ug/mL, Sigma Cat. C-7761) em tampão carbonato (0.1M NaHCO₃, 0.1M Na₂CO₃, pH 9,6) por 16 h à 4°C. Em seguida, a placa foi lavada com PBS-T 0,05% e bloqueada com 5% de leite desnatado em PBS-T no volume de 300 μ l/poço por 30min 37°C. Após a lavagem, 100 μ l/poço das amostras de soro diluídas (1:96.000) em PBS-T foram aplicadas na placa e incubadas por 60min a 37°C. Como curva padrão foi empregada uma diluição seriada na razão ½ do padrão para C3 (110mg/dL). Em seguida, a placa foi lavada 3 vezes e 100 μ l/poço do anticorpo secundário anti-C3 humano feito em cabra conjugado à peroxidase (Cappel Cat.# 55237 Lot.#07618) foi aplicado na diluição 1:24000 em PBS-T com 5% de leite desnatado e incubado por 60min a 37°C. Após a lavagem, foi aplicado 100 μ l/poço do revelador TBM (KPL Cat.53-00-03) e após 10min de incubação a temperatura ambiente a reação foi interrompida com a adição de 100 μ l/poço de HCl 1M. a absorbância foi lida a 450 nm em leitor de microplaca.

Os níveis séricos do C5a foram avaliados em 40 pacientes, sendo 29 com lesões cervicais pré-invasivas (NIC I = 15, NIC II =14) e 11 CC= 11 e 50 controles, sendo 16 mulheres com teste de citologia cervical normal (controle normal) e 34 com teste de citologia cervical normal e com cervicite (grupo cervicite) usando kit comercial (BD OptEIA, San Diego, CA, USA) de ELISA sanduíche. Os grupos foram pareados por idade (média em controles saudáveis: 42,9 anos; grupo cervicite: 38,7 anos; CC: 37,5 anos; NIC I/II: 35,6 anos; $p>0,05$) e ancestralidade (Eurodescendentes em controles saudáveis: 81%, controle cervicite: 82%, CC: 64%, NIC I/II 76%; $p>0,05$). As amostras utilizadas na quantificação foram mantidas refrigeradas após a coleta e durante seu processamento, e armazenadas a -80 °C, para preservação dos componentes do complemento (AFONSO MAESTRI et al., 2018). Para análise de quantificação do C3 e C5a foram utilizadas amostras coletadas entre março de 2019 a março de 2020. As amostras coletadas entre julho de 2017 a novembro de 2017 não possuíam soro disponíveis para uso.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas e genóticas foram determinadas por contagem direta. Os haplótipos foram inferidos usando os algoritmos EML e EBL usando o programa Arlequin (v.3.1). Distribuições genóticas de euro e afro-brasileiras em controle e pacientes foram comparadas usando o teste exato de diferenciação populacional (Raymond e Rousset 1995) e avaliadas para a hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Guo e Thompson 1992), usando o software Arlequin pacote v.3.1. Para as análises de associação, foram realizados testes de independência entre as variáveis por meio do teste do qui-quadrado com correção de Yates ou teste de Fisher bicaudal. Os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram aplicados para avaliação da normalidade dos dados de quantificação de C3 e C5a através do software GraphPad Prism 3.0. As comparações entre as médias foram realizadas por meio dos testes t e Mann-Whitney. A estatística descritiva em relação às concentrações séricas de C3 foram apresentadas como média e desvio padrão e as de C5a como mediana e intervalo interquartil. As análises de correlação foram realizadas através do teste de correlação de Spearman. Valores de $p < 0,05$ foram ajustados por análise de regressão logística com o programa STATA v.9.2 (StataCorp, EUA). As covariáveis idade, ancestralidade, uso de anticoncepcional oral, número de gestações, escolaridade e estado civil foram incluídas no modelo de regressão logística quando apresentaram valor de $p \leq 0,2$ na análise univariada. Valores de $p > 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

Esta dissertação foi escrita em modelo misto, sendo que os resultados e discussão serão apresentados na forma de artigo.

POLIMORFISMOS DO GENE C3 E NÍVEIS SÉRICOS DOS COMPONENTES C3 E C5a DO COMPLEMENTO EM MULHERES COM CÂNCER CERVICAL E LESÕES PRÉ-INVASIVAS

RESUMO

Introdução: Os componentes C3 e C5a são moléculas centrais na ativação do Sistema Complemento (SC) e já foram associados a tumorigênese de diversos tipos de cânceres. Neste estudo, investigamos a associação entre polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene C3 e o CC, bem como dos níveis séricos dos componentes C3 e C5a em mulheres com neoplasias intraepiteliais (NIC) de grau I e II e CC. **Métodos:** Os SNPs do gene C3 (rs2250656; rs2230199 e rs1047286) foram avaliados por PCR sequência específica em 86 mulheres com CC e 78 controles. Os níveis séricos de C3 foram avaliados em 40 pacientes (NIC I = 15, NIC II =14 e CC= 11) e em 66 controles e, de C5a em 40 pacientes (NIC I = 15, NIC II =14 e CC= 11) e 50 controles através do método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

Resultados: Não foi observada associação entre os polimorfismos do gene C3 e o CC ou seus tipos histológicos. Os níveis séricos do C3 foram significativamente menores em mulheres com NIC I ($p=0,001$), NIC II ($p=0,019$), NIC I/II ($p=0,002$) e CC ($p=0,049$) que no grupo controle saudável, porém não foi observada diferença significativa na concentração de C5a entre os grupos de estudo. **Conclusão:** Níveis séricos reduzidos do C3 foram associados às lesões pré-invasivas e ao CC, sugerindo consumo do C3 frente à ativação do SC no processo da doença. O possível papel do C3 no CC parece ser independente dos polimorfismos funcionais avaliados. Estudos futuros devem esclarecer seu papel na imunopatologia de NICs e CC como um possível fator pró ou antitumoral.

Palavras-chaves: componente C3; componente C5a; complemento; câncer cervical; neoplasias intraepiteliais cervicais.

INTRODUÇÃO

O câncer cervical (CC) é o quarto tipo de câncer mais incidente e a quarta principal causa de morte por câncer em mulheres, com uma estimativa de 604.000 novos casos e 342.000 mortes em todo o mundo em 2020 (SUNG et al., 2021). O agente etiológico do CC é o papilomavírus humano (HPV), que é transmitido principalmente sexualmente (BRAY et al., 2018). Ao contrário da maioria dos cânceres, o CC em alguns casos é precedido por lesões precursoras que podem persistir por um longo tempo até tornar-se um câncer invasivo, o que possibilita seu rastreamento através da triagem citológica cervical (teste de Papanicolaou). Estas lesões podem ser classificadas de acordo com a Classificação de Richart tendo base na extensão de displasia no epitélio que pode variar em: neoplasia intraepitelial cervical de grau I (NIC I - displasia leve); NIC II (displasia moderada) e NIC III (displasia grave e carcinoma *in situ*) (SCHIFFMAN et al., 2016). Entretanto, apenas a infecção pelo HPV não é suficiente para o desenvolvimento de lesões pré-câncer ou CC, sendo para isto necessário a participação de fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro, bem como aspectos ambientais, os quais conjuntamente atuam no desenvolvimento e progressão da doença (DOORBAR et al., 2012).

Dentre os fatores imunológicos, o sistema complemento (SC) destaca-se como parte do sistema imune inato, atuando em diversos processos biológicos essenciais para a defesa do organismo, incluindo o reconhecimento, fagocitose, lise e opsonização de patógenos e células tumorais (RICKLIN et al., 2010; REIS et al., 2017). A ativação do SC pode ocorrer através de três diferentes vias, que são: via clássica (VC), via das lectinas (VL) e a via alternativa (VA) as quais convergem a uma via comum que age na clivagem do componente central da cascata, o C3. A clivagem de C3 desencadeia a formação dos fragmentos C3a, uma anafilatoxina que atua no recrutamento e ativação de células efetoras da resposta inflamatória e do C3b, o qual se liga a superfície de patógenos e células tumorais sinalizando para fagocitose (RICKLIN et al., 2016). C3b também é um dos componentes da C5 convertase, um complexo enzimático que cliva C5 produzindo C5a uma potente anafilotoxina, e C5b. A deposição do fragmento C5b na célula alvo culmina na formação do complexo de ataque à membrana (MAC; C5b-9) levando a citólise (BAYLY-JONES; BUBECK; DUNSTONE, 2017; KONDOS et al., 2010).

Nas últimas décadas, estudos vêm apontando um duplo papel do SC no câncer (REIS et al., 2017; REVEL et al., 2020; MARKIEWSKI et al., 2008). Componentes do SC podem promover uma resposta imune antitumoral através da citólise e modulação da resposta imune inata; entretanto, sua ativação desequilibrada no microambiente tumoral contribui para imunossupressão de células T locais e inflamação crônica, promovendo a evasão imunológica do tumor, crescimento e metástase (REIS et al., 2017, MARKIEWSKI et al., 2008, CORRALES et al., 2012).

Diferentes estudos com o componente C3 exemplificam essa dualidade funcional do complemento no câncer. Seu papel na lise em linhagem celular de tumor renal humano, bem como na supressão tumoral no câncer de pulmão de não pequenas células indicaram uma possível função anti-tumoral (BLOK et al., 1998; LIN et al., 2014). Por outro lado, houve redução significativa no crescimento tumoral em modelo animal de CC que não produz o componente C3 (MARKIEWSKI et al., 2008). Além disso, níveis elevados de C3 foram observados no soro de pacientes com diferentes tipos de tumores incluindo CC (DOWLING et al., 2012; JEONG et al., 2008; YEKTA et al., 2018), sugerindo que C3 possa ser um biomarcador nessas condições e um possível alvo terapêutico no tratamento de alguns cânceres.

Já a presença de fragmentos C5a no microambiente tumoral tem sido relacionada ao favorecimento da progressão tumoral (AJONA; ORTIZ-ESPINOSA; PIO, 2019; REVEL et al., 2020). C5a parece atuar no recrutamento de células supressoras de origem mielóide (MDSC), as quais suprimem a resposta anti tumoral mediada por células T CD8+, favorecendo o crescimento do tumor em modelo animal de CC (MARKIEWSKI et al., 2008). C5a também parece participar da tumorigênese e metástase, ao regular positivamente a expressão de moléculas que suprimem as respostas imunes locais, em modelo animal de câncer de pulmão e cólon (CORRALES et al., 2012; PIAO et al., 2015).

Fatores genéticos do hospedeiro também podem influenciar no desenvolvimento e progressão do CC (CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003). Polimorfismos comuns presentes no gene C3 (ENSG00000125730) (rs2230199: C>G [p.Arg102Gly] e rs1047286: C>T [p.Pro314Leu]) afetam a estrutura proteica de C3b, impactando na ativação do SC (HEURICH et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 2015), e já foram associados a diversas doenças inflamatórias (ROOSTAEI et al., 2019; SENA et al., 2020; TÖRN et al., 2016; YATES et al., 2007), e o rs2250656

(A>G) já foi associado com síndrome metabólica (SM): entretanto, não há estudos avaliando seu possível impacto no CC.

Considerando o relevante papel do SC na tumorigênese, o presente estudo teve como objetivo avaliar a possível associação de polimorfismos do gene C3 no CC, bem como dos níveis séricos dos componentes C3 e C5a na patogênese de NIC I, NIC II e CC.

MATERIAIS E MÉTODOS

COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Erasto Gaertner (HEG) (Curitiba, PR, Brasil), (CAAE: 62542616.7.0000.0098, aprovado em: 07-05-2017) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná (CAAE: 02385318.4.3001.0101, aprovado em 22-02-2019). Todos os indivíduos incluídos no estudo aceitaram participar da pesquisa e assinaram o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido)

Desenho do estudo e caracterização da Amostra

Trata-se de um estudo transversal que investigou 86 pacientes com CC (63 com carcinoma de células escamosas (CCE), 15 adenocarcinoma, 8 sem classificação histopatológica disponível) e 29 com lesões cervicais pré-invasivas (15 com NIC I e 14 com NIC II). Todos os casos foram diagnosticados com base no resultado do exame citológico associado a colposcopia cervical, e o grupo NIC II e CC foram ainda confirmados com exame histopatológico. As participantes com CC e NIC foram recrutadas no ambulatório de ginecologia do Hospital Erasto Gaertner (Curitiba, PR, Brasil) no período de julho de 2017 a novembro de 2017, e março de 2019 a março de 2020. Os critérios de inclusão das pacientes foram: idade acima de 18 anos, e com diagnóstico de NIC ou CC. Os critérios de exclusão das pacientes foram: idade abaixo de 18 anos, gravidez, HIV positivo, doenças autoimunes, uso de medicamentos corticoides e transfusão sanguínea nos últimos 60 dias.

O grupo controle foi constituído por 78 mulheres com citologia negativa para NIC e CC, recrutadas pela Unidade de Saúde Nossa Senhora Aparecida (Curitiba,

PR, Brasil) no período de março de 2019 a março de 2020. Do total de controles, 19 mulheres apresentavam teste de citologia cervical normal sem indicação de inflamação no colo do útero e 59 com teste de citologia cervical normal e com cervicite, uma infecção no cervix geralmente causada por microrganismos como *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* (ORTIZ-DE LA TABLA; GUTIÉRREZ, 2019). Os critérios de inclusão dos controles foram: mulheres com 18 anos ou mais, com citologia negativa para NIC e CC, sem queixas clínicas, autodeclaradas sem doenças inflamatórias crônicas. Os critérios de exclusão foram os mesmos aplicados às pacientes com NIC ou CC. Dados clínicos, sociodemográficos e características da saúde reprodutiva foram obtidos para pacientes e controles através de consulta à prontuário eletrônico e entrevista por questionário padronizado. Amostras de sangue periférico foram coletadas de todas as participantes, para posterior análise genética e de marcadores sorológicos, e armazenadas a -80 °C.

Genotipagem de polimorfismos do gene C3

Pacientes com CC e controles (Tabela 1) foram genotipados para três polimorfismos do gene C3: rs2250656:A>G, que ocorre no intron 2, rs2230199:C>G [p.Arg102Gln], no exon 3 e rs1047286:C>T [p.Pro314Leu] no exon 9 (Material Suplementar), através de PCR sequência-específica (PCR-SSP), segundo método descrito por Sena et al., 2020. Os polimorfismos avaliados no presente trabalho foram selecionados considerando seu impacto na atividade da proteína C3 (HEURICH et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 2015), associação com doenças inflamatórias (ROOSTAEI et al., 2019; SENA et al., 2020; TÖRN et al., 2016; YATES et al., 2007), bem como sua frequência populacional através da base de dados Ensembl (<http://www.ensembl.org>). A extração de DNA foi realizada através do método de salting-out de acordo com Cardozo (CARDOZO et al., 2009). As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, USA) e diluídas a 50 ng/ul e armazenadas a -20°C até a amplificação.

Tabela 1. Dados sociodemográficos e características da saúde reprodutiva do grupo de controle e CC

Variável	Controle n=78	%	CC n=86	%	p
Idade					0,0006
20-35	25	32,05	11	12,79	
31-40	14	17,95	25	29,07	
41-50	25	32,05	17	19,77	
>51	14	17,95	33	38,37	
Ancestralidade					0,073
Eurodescendente	61	76,9	75	87,2	
Afrodescendente	13	16,7	11	12,8	
Indígena	4	6,4	0	0,0	
^a Escolaridade					0,025
Ensino fundamental	36	46,2	55	64,0	
Ensino médio	27	34,6	24	27,9	
Ensino superior	12	15,4	6	7,0	
Nenhum estudo	0	0,0	1	1,2	
Não informado	3	3,8	0	0,0	
Estado civil					0,006
Solteira	18	23,1	6	7,0	
Casada/União estável	47	60,3	57	66,3	
Divorciada	6	7,7	11	12,8	
Viúva	3	3,8	11	12,8	
Dados ausentes	4	5,1	1	1,2	
Tabagismo					< 0,0001
Tabagista	11	14,1	17	19,8	
Ex-tabagista	3	3,8	23	27,6	
Não tabagista	64	82,1	46	53,5	
Idade da primeira relação sexual (anos)					0,490
≤18	64	82,1	65	75,6	
19-34	13	16,7	18	20,9	
Não informado	1	1,3	3	3,5	

Número de gestações					
0	14	17,9	2	2,3	0,006
1	10	12,8	15	17,4	
2	19	24,4	18	20,9	
≥3	35	44,9	51	59,3	
Uso de preservativo (últimos 12 meses)					
					0,864
Sim	23	29,5	24	27,9	
Não	55	70,5	61	70,9	
Uso de anticoncepcional oral					
Sim	23	29,5	55	64,0	< 0,0001
Não	55	70,5	29	33,7	
Não informado	0	0,0	2	2,3	

Valores de $p < 0,05$ são mostrados em negrito. ^aBaseado no sistema educacional brasileiro.

Quantificação dos componentes C3 e C5a do Complemento

Os níveis séricos de C3 foram avaliados em 40 pacientes, sendo 29 com lesões cervicais pré-invasivas (NIC I = 15, NIC II = 14) e 11 com CC e, em 66 controles, sendo 19 mulheres com teste de citologia cervical normal (controle saudável) e 47 com teste de citologia cervical normal e com cervicite (grupo cervicite). O grupo cervicite foi utilizado como um grupo de comparação para as avaliações de dosagens séricas do SC, visto que a infecção poderia influenciar nas quantificações realizadas (LAUSEN et al., 2018; LEWIS; RAM, 2020). Os grupos de análise foram pareados por idade (média em controles saudáveis: 42,5 anos; grupo cervicite: 38,0 anos; CC: 37,5 anos; NIC I/II: 35,6 anos; $p > 0,05$) e ancestralidade (Euro-descendentes em controles saudáveis: 84%, grupo cervicite: 81%, CC: 64%, NIC I/II 76%; $p > 0,05$). A dosagem de C3 foi realizada utilizando o método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA ou Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) desenvolvida *in house* (GRACIA et al., 2021). Para isso, placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 μ l de anticorpo policlonal anti-C3 humano feito em cabra (3.4ug/mL, Sigma Cat. C-7761) em tampão carbonato (0.1M NaHCO₃, 0.1M Na₂CO₃, pH 9,6) por 16 h à 4°C. Em seguida, a placa foi lavada com PBS-T 0,05% e bloqueada com 5% de leite desnatado em PBS-T no volume de 300 μ l/poço por

30min 37°C. Após a lavagem, 100 µl/poço das amostras de soro diluídas (1:96.000) em PBS-T foram aplicadas na placa e incubadas por 60min a 37°C. Como curva padrão foi empregada uma diluição seriada na razão ½ do padrão para C3 (110mg/dL). Em seguida, a placa foi lavada 3 vezes e 100 µl/poço do anticorpo secundário anti-C3 humano feito em cabra conjugado à peroxidase (Cappel Cat.# 55237 Lot.#07618) foi aplicado na diluição 1:24000 em PBS-T com 5% de leite desnatado e incubado por 60min a 37°C. Após a lavagem, foi aplicado 100 µl/poço do revelador TBM (KPL Cat.53-00-03) e após 10min de incubação a temperatura ambiente a reação foi interrompida com a adição de 100µl/poço de HCl 1M. a absorbância foi lida a 450 nm em leitor de microplaca.

Os níveis séricos de C5a foram avaliados em 40 pacientes, sendo 29 com lesões cervicais pré-invasivas (NIC I = 15, NIC II =14) e 11 CC= 11 e 50 controles, sendo 16 mulheres com teste de citologia cervical normal (controle normal) e 34 com teste de citologia cervical normal e com cervicite (grupo cervicite) usando kit comercial (BD OptEIA, San Diego, CA, USA) de ELISA sanduíche. Os grupos foram pareados por idade (média em controles saudáveis: 42,9 anos; grupo cervicite: 38,7 anos; CC: 37,5 anos; NIC I/II: 35,6 anos; $p>0,05$) e ancestralidade (Eurodescendentes em controles saudáveis: 81%, controle cervicite: 82%, CC: 64%, NIC I/II 76%; $p>0,05$). As amostras utilizadas na quantificação foram mantidas refrigeradas após a coleta e durante seu processamento, e armazenadas a -80 °C, para preservação dos componentes do complemento (AFONSO MAESTRI et al., 2018). Para análise de quantificação de C3 e C5a foram utilizadas amostras coletadas entre março de 2019 a março de 2020. As amostras coletadas entre julho de 2017 a novembro de 2017 não possuíam soro disponíveis para uso.

Análise estatística

As frequências alélicas e genotípicas foram determinadas por contagem direta. Os haplótipos foram inferidos usando os algoritmos EML e EBL usando o programa Arlequin (v.3.1). Distribuições genotípicas de euro e afro-brasileiras em controle e pacientes foram comparadas usando o teste exato de diferenciação populacional (Raymond e Rousset 1995) e avaliadas para a hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Guo e Thompson 1992), usando o software Arlequin pacote v.3.1. Para as análises de associação, foram realizados testes de independência entre as

variáveis por meio do teste do qui-quadrado com correção de Yates ou teste de Fisher bicaudal. Os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram aplicados para avaliação da normalidade dos dados de quantificação de C3 e C5a através do software GraphPad Prism 3.0. As comparações entre as médias foram realizadas por meio dos testes t e Mann-Whitney. A estatística descritiva em relação às concentrações séricas de C3 foram apresentadas como média e desvio padrão e as de C5a como mediana e intervalo interquartil. As análises de correlação foram realizadas através do teste de correlação de Spearman. Valores de $p < 0,05$ foram ajustados por análise de regressão logística com o programa STATA v.9.2 (StataCorp, EUA). As covariáveis idade, ancestralidade, uso de anticoncepcional oral, número de gestações, escolaridade e estado civil foram incluídas no modelo de regressão logística quando apresentaram valor de $p \leq 0,2$ na análise univariada. Valores de $p > 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

Polimorfismos do gene C3

A distribuição genotípica dos polimorfismos do gene C3 encontram-se em equilíbrio Hardy-Weinberg em ambos os grupos, controles e CC ($p > 0,05$). As frequências alélicas/genotípicas dos SNPs estudados apresentaram similaridade àquelas encontradas em europeus de acordo com o banco de dados de SNPs (<http://www.ensembl.org/index.html>). Euro- e afro-brasileiros, também apresentaram frequências genotípicas semelhantes.

Não foi observada diferença significativa nas frequências alélicas e genotípicas dos SNPs do gene C3 entre o grupo controle e CC ou entre aos tipos histológicos CCE e adenocarcinoma (Tabela 2). Os três polimorfismos de C3 avaliados, resultaram na combinação de cinco haplótipos (ACC, GCC, AGT, GCT, AGC). Observamos uma associação do haplótipo C3 GCC com pacientes com CC do tipo CCE na análise univariada, entretanto, a significância não se manteve após ajuste por regressão logística (Tabela 3). Os demais haplótipos de C3 também não foram associados ao CC ou aos tipos histológicos avaliados de CC (Tabela 3).

Tabela 2. Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos do gene C3.

C3 SNPs (localização)	Controle n= 78	CC n=86	CCE n=63	Adenocarci- ma n=15	Controle vs. CC	Controle vs. CCE	Controle vs. Adenoc.	CCE vs. Adenoc.
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	p	p	p	p
rs2250656 (Intron 2)								
AA	46 (59,0)	40 (46,5)	27 (42,9)	7 (50,0)	0,102 [#]	0,058 [#]	0,279 [#]	0,836 [#]
AG	29 (37,2)	36 (41,9)	28 (44,4)	5 (35,7)	0,120 [§]	0,064 [§]	0,568 [§]	0,768 [§]
GG	3 (3,8)	10 (11,6)	8 (12,7)	2 (14,3)	0,085 ^{&}	0,063 ^{&}	0,165 ^{&}	1,000 ^{&}
A	121 (77,6)	116 (67,4)	82 (65,1)	19 (67,9)	0,410	0,250	0,335	0,830
G	35 (22,4)	56 (32,6)	44 (34,9)	9 (32,1)				
rs2230199 (Exon 3)								
CC	60 (76,9)	69 (80,2)	52 (82,5)	10 (71,4)	0,284 [#]	0,319 [#]	0,060 [#]	0,418 [#]
CG	18 (23,1)	15 (17,4)	10 (15,9)	3 (21,4)	0,704 [§]	0,530 [§]	0,736 [§]	0,455 [§]
GG	0 (0,0)	2 (2,3)	1 (1,6)	1 (7,1)	0,498 ^{&}	0,447 ^{&}	0,152 ^{&}	0,333 ^{&}
C	138 (88,5)	153 (88,9)	114 (90,5)	23 (82,1)	1,000	0,699	1,000	0,737
G	18 (11,5)	19 (11,1)	12 (9,5)	5 (17,9)				
rs1047286 (Exon 9)								
CC	61 (78,2)	72 (83,7)	53 (84,1)	11 (78,6)	0,357 [#]	0,399 [#]	0,053 [#]	0,102 [#]
CT	17 (21,8)	13 (15,1)	10 (15,9)	2 (14,3)	0,427 [§]	0,399 [§]	1,000 [§]	0,695 [§]
TT	0 (0,0)	1 (1,2)	0 (0,0)	1 (7,1)	1,000 ^{&}	na	0,152 ^{&}	0,182 ^{&}
C	139 (89,1)	157 (91,3)	116 (92,1)	24 (85,7)	0,578	0,424	0,533	0,286
T	17 (10,9)	15 (8,7)	10 (7,9)	4 (14,3)				

#Modelo aditivo: genótipo de maior frequência vs heterozigoto vs genótipo de menor frequência;
 §Modelo dominante: genótipo de maior frequência vs. heterozigoto/genótipo de menor frequência;
 &Modelo recessivo: genótipo de maior frequência/heterozigoto vs. genótipo de menor frequência; na= não se aplica.

Tabela 3. Haplótipos do gene C3 em controle e CC.

Haplótipos C3	Controle n=156	CC n=172	CCE n=126	Adenocarci- noma n=30	Controle vs. CC		Controle vs. CCE		Controle vs. Adenoc.	CCE vs. Adenoc.
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	p bruto	p ajust.*	p bruto	p ajust.*	p	p
ACC	103 (66,0)	97 (56,4)	70 (55,6)	15 (50,0)	0,132 [#]		0,119 [#]		0,209 [#]	0,858 [#]
					0,089 ^{&}		0,085 ^{&}		0,102 ^{&}	0,684 ^{&}
					0,084 [§]		0,063 [§]		0,157 [§]	0,825 [§]
GCC	35 (22,4)	55 (32,0)	43 (34,1)	10 (33,4)	0,044 [#]	0,346 [#]	0,028 [#]	0,167 [#]	0,099 [#]	0,903 [#]
					0,063 ^{&}		0,033 ^{&}	0,250 ^{&}	0,244 ^{&}	1,000 ^{&}
					0,032 [§]	0,348 [§]	0,021 [§]	0,274 [§]	0,058 [§]	0,752 [§]
AGT	17 (10,9)	14 (8,1)	9 (7,1)	4 (13,3)	0,192 [#]		0,308 [#]		0,697 [#]	0,240 [#]
					0,452 ^{&}		0,308 ^{&}		0,753 ^{&}	0,277 ^{&}
					0,500 [§]		n.a [§]		0,250 [§]	0,360 [§]
AGC	1 (0,7)	5 (2,9)	3 (2,4)	1 (3,3)	0,218 [#]		0,328 [#]		0,328 [#]	0,578 [#]
					0,218 ^{&}		0,328 ^{&}		0,297 ^{&}	0,578 ^{&}
					n.a [§]		n.a [§]		n.a [§]	n.a [§]
GCT	0	1 (0,6)	1 (0,8)	0	1,000 [#]		n.a [#]		n.a [#]	n.a [#]
					1,000 ^{&}		0,447 ^{&}		n.a ^{&}	n.a ^{&}
					n.a [§]		n.a [§]		n.a [§]	n.a [§]

*valor de p ajustado por idade, ancestralidade, uso de anticoncepcional oral e número de gestações. na=não se aplica; #Modelo aditivo: homocigoto para o haplótipo de análise vs heterocigoto vs demais haplótipos; &Modelo dominante: homocigoto/heterocigoto para o haplótipo de análise vs. demais haplótipos; \$Modelo recessivo: homocigoto para o haplótipo de análise vs. demais haplótipos;

Concentrações de C3 e C5a em pacientes com NIC e CC

Os níveis séricos de C3 foram significativamente menores em mulheres com NIC I (média: $82,0 \pm 9,7$ mg/dl; $p=0,001$), NIC II (média: $85,9 \pm 21,7$ mg/dl; $p=0,019$), com NIC I/II [lesões cervicais pré-invasivas] (média: $83,9 \pm 16,4$ mg/dl; $p=0,002$) e CC (média: $87,2 \pm 28,0$ mg/dl; $p=0,049$) em relação às do grupo controle saudável (média: $106,8 \pm 23,7$ mg/dl). Também houve diferença significativa nos níveis de C3 entre pacientes NIC I (média: $82,0 \pm 9,7$ mg/dl; $p=0,042$) e NIC I/II (média: $83,9 \pm 16,4$ mg/dl; $p=0,029$) quando comparados ao grupo com cervicite (média: $97,8 \pm 24,3$ mg/dl) (Figura 1). Não foi observada diferença entre os demais grupos avaliados. Também não houve associação entre os polimorfismos avaliados e os níveis de C3 no grupo de controle saudável e cervicite (Material Suplementar).

Os níveis séricos do C5a não foram significativamente diferentes entre os grupos avaliados, como mostra a Figura 2. A mediana de C5a nos grupos foi de : 55,0 ng/mL [51-64 ng/mL] em controle saudável; 60,5 ng/mL [53-73 ng/mL] no grupo cervicite; 60,0 ng/mL [52-75 ng/mL] em NIC I; 54,5 ng/mL [46-78 ng/mL] em NIC II, 58 ng/mL [51-75 ng/mL] em NIC I/II e 55,0 ng/mL [52-63 ng/mL] em CC. Também não houve correlação entre os níveis séricos de C3 e C5a em mulheres com NIC I ($r= 0,49$; $p=0,06$), NIC II ($r= 0,38$; $p=0,17$) ou CC ($r= 0,08$ $p=0,08$), bem como no grupo controle saudável ($r=-0,40$, $p=0,88$) e cervicite ($r=0,07$, $p=0,70$).

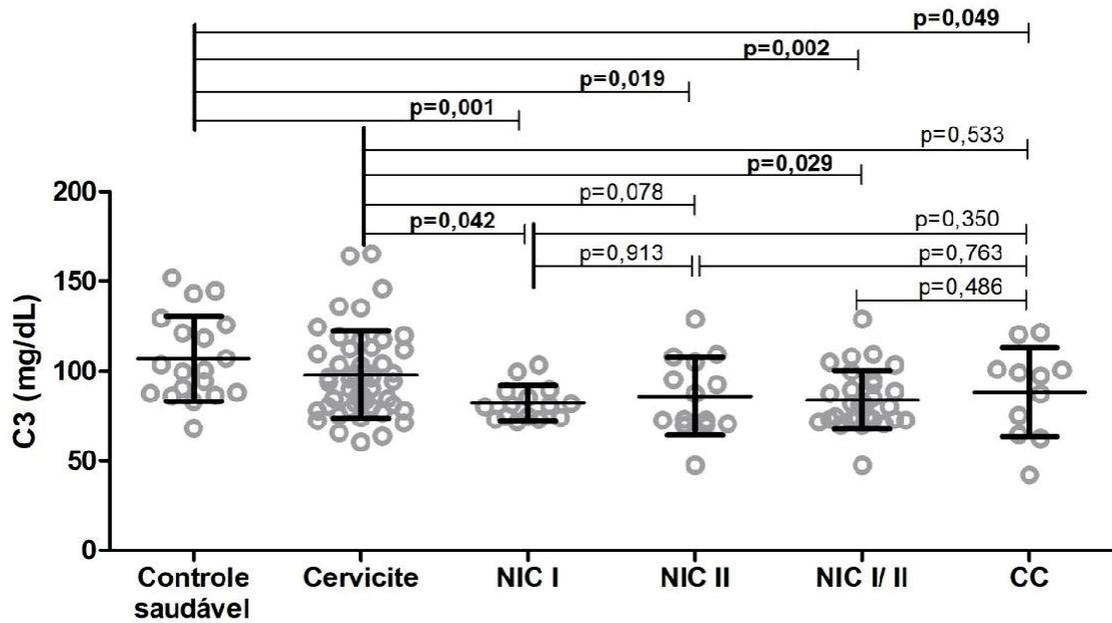


Figura 1. Concentrações séricas do C3 no grupo controle saudável e com cervicite, NIC I, NIC II e CC.

Valores de p ajustados por regressão logística (ajustado por idade, ancestralidade, uso de anticoncepcional oral e número de gestações.)

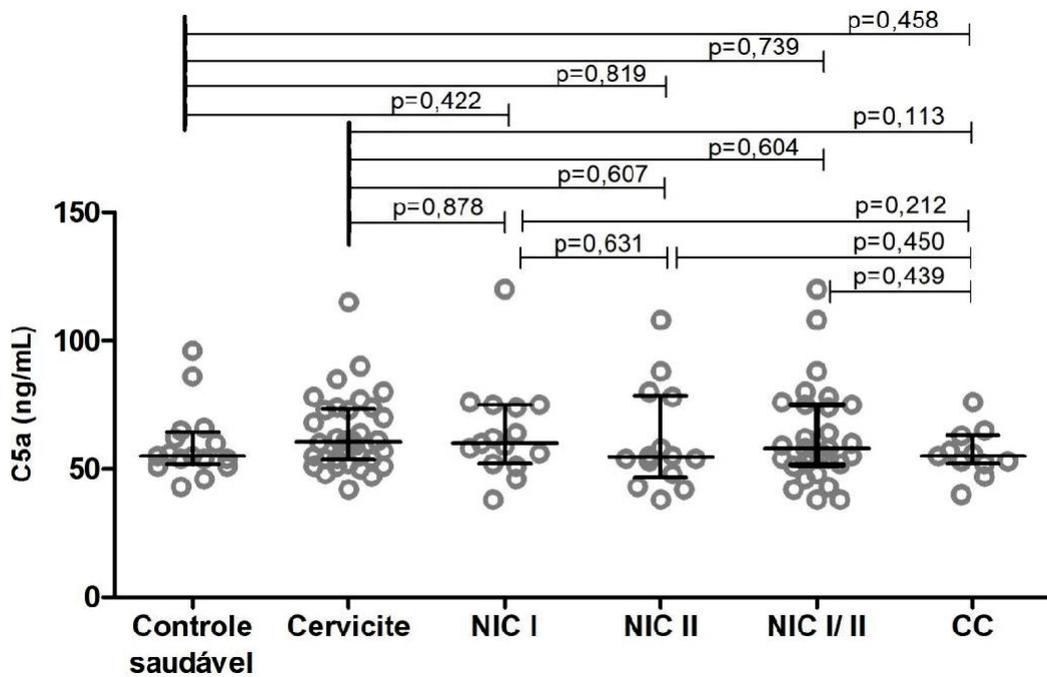


Figura 2. Concentrações séricas do C5a no grupo controle saudável e com cervicite, NIC I, NIC II e CC.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo, sugerem que o componente C3 do SC possui um papel na imunopatologia de lesões cervicais pré-invasivas e no CC. Por outro lado, os níveis do C5a não foram relacionados às NICs ou CC, nem os polimorfismos rs2250656:A>G, rs2230199:C>G e rs1047286:C>T do gene C3 ao CC.

A redução dos níveis séricos do C3 em pacientes com NIC I, II e CC podem indicar seu consumo frente a ativação do SC no microambiente tumoral de CC e lesões cervicais pré-invasivas. Essa hipótese é corroborada pelo trabalho que observou extensa deposição de produtos de clivagem de C3 (C3b, iC3b, C3c) no tecido tumoral de modelo de camundongo com CC, indicando ativação local do SC (MARKIEWSKI et al., 2008). Interessantemente, Markiewski e colaboradores observaram que a ativação do SC, bem como a sinalização de C5a, foram requeridos para o recrutamento de células supressoras de origem mielóide (MDSC), as quais suprimiram a resposta antitumoral mediada por células T CD8+, favorecendo o crescimento do tumor (MARKIEWSKI et al., 2008). Neste sentido, a redução dos níveis séricos de C3 observados neste trabalho poderia indicar seu consumo frente à participação do SC em mecanismos pró-tumorais. Por outro lado, menores níveis de C3 poderiam resultar, em parte, da ativação do SC devido ao mecanismo de imunovigilância de células tumorais e das alterações no epitélio de lesões pré-invasivas (Figura 3). A possível participação do SC na imunopatogênese do CC já foi proposta em estudo anterior indicando níveis elevados de MASP-1, MASP-2 e MAP-19 nesses pacientes (MAESTRI et al., 2018), enquanto MBL parece não impactar na progressão para o CC invasivo (MAESTRI et al., 2017). As diferenças observadas no presente estudo entre pacientes e controles para os níveis de C3 devem ser interpretadas com cuidado, dado o baixo tamanho amostral dos grupos. Estudos adicionais são necessários para elucidar o papel de C3 na fisiopatologia de NIC e CC como um possível fator de estímulo ou repressão da tumorigênese.

Em contraste com nossos achados, níveis elevados de C3 foram observados em pacientes com CC e NIC III (JEONG et al 2008, CANALES et al., 2014). Jeong et al (2008) relataram aumento de C3 em plasma de pacientes coreanas com CC comparado a mulheres em tratamento para doenças cervicais benignas (JEONG et

al., 2008). Resultados semelhantes foram observados por Canales et al, (2014) no soro de pacientes mexicanas com NIC III positivas para HPV-16 comparado a controles HPV negativo (CANALES et al., 2014). Alguns fatores podem ter contribuído para os achados discrepantes com relação ao presente estudo, como a inclusão de indivíduos em tratamento para doenças cervicais benignas e diferentes métodos de quantificação e populações estudadas (HEURICH et al., 2011; RICKLIN et al., 2016). O presente estudo incluiu uma coorte pareada por idade e ancestralidade, e que não estava recebendo tratamento para CC ou outras doenças que acometem a cérvix.

O consumo do componente C3 devido a possível ativação do SC em lesões cervicais pré-invasivas e no CC seria acompanhado do aumento dos níveis séricos de C5a nessas pacientes, entretanto, nossos resultados não indicaram alteração na concentração de C5a em pacientes com NIC I, II ou CC. O pequeno tamanho amostral nos grupos de análise do presente estudo pode ter contribuído para o resultado obtido. No entanto, deve-se considerar que ativação do SC pode ser compensada pela expressão de proteínas reguladoras (AFSHAR-KHARGHAN, 2017; REVEL et al., 2020), sendo um mecanismo descrito para diferentes células tumorais, especialmente de tumores sólidos, limitando a citotoxicidade mediada pelo complemento (REIS et al., 2017). Guo e colaboradores encontraram aumento da proteína CFHR1 no plasma de mulheres com CC comparado a controles (GUO; HAO; KAMILIJANG, 2014). CFHR1 regula o SC, bloqueando a atividade da C5 convertase e a consequente formação de C5a, deposição de C5b e formação de MAC (HEINEN et al., 2016). Nesse contexto, é possível supor que o resultado obtido com C5a em pacientes com NIC e CC seja, pelo menos em parte, devido à atuação de reguladores do SC. Ainda, Yuan e colaboradores observaram que a deposição do C3 no tecido tumoral gástrico estava associado ao crescimento tumoral, mas não foi correlacionado com aumento dos níveis plasmáticos de C5a (YUAN et al., 2020). Os autores sugeriram que a deposição de C3 atua na ativação da via JAK2/STAT3, a qual sinaliza para crescimento tumoral e metástase (YUAN et al., 2020). O possível papel de C3 na promoção tumoral através da via STAT3 no CC e lesões pré-câncer ainda não foi investigado, entretanto, a atuação de C3 em vias não convencionais poderia justificar a ausência de alteração nos níveis de C5a.

Por outro lado, o aumento dos níveis plasmáticos do componente C5a já foi observado em pacientes com câncer de pulmão (CORRALES et al., 2012), tendo

sido associado tanto a redução do tumor em modelo animal de câncer de mama e linfoma (GUNN et al., 2015; KIM et al., 2005) quanto ao estímulo do crescimento tumoral em modelo para CC (MARKIEWSKI et al., 2008). O papel do C5a no microambiente tumoral não está completamente estabelecido, visto que os componentes do SC contribuem funcionalmente para uma infinidade de processos imunológicos e inflamatórios distintos, cada um deles tendo um contexto único, dependendo do tipo de tumor (BANDINI et al., 2013). Estudos adicionais com uma coorte maior são necessários para estabelecer o papel de C5a em NIC e CC.

O papel de C3 no CC parece ser independente dos polimorfismos do gene C3 avaliados neste trabalho, visto que não houve diferença nas frequências genotípicas/alélicas ou haplotípicas nos grupos avaliados, nem sobre a concentração sérica de C3.

Nosso estudo possui algumas limitações. O pequeno tamanho amostral, especialmente de pacientes com NICs e CC quantificados para os componentes C3 e C5a pode ter impactado os resultados obtidos. Além disso, as amostras não possuem genotipagem para os principais tipos de HPVs oncogênicos (HPV16 e HPV18), o que seria importante para melhor caracterização do grupo controle, bem como para classificação de pacientes com maior risco de progressão para CC. Estudos futuros incluindo uma coorte maior de pacientes contemplando todos os estágios de NIC e CC são necessários para conclusões definitivas sobre o papel dos polimorfismos do gene C3, bem como dos componentes C3 e C5a em lesões pré-câncer e no CC.

CONCLUSÃO

Em resumo, nossos resultados sugerem que o componente C3 possui um papel na fisiopatologia de lesões pré-invasivas e no CC, possivelmente independente dos polimorfismos funcionais avaliados. A ausência de impacto nos níveis séricos do C5a em pacientes com NICs e CC pode indicar a expressão de reguladores do SC por células tumorais, bem como, a atuação de C3 em vias não convencionais, os quais ainda precisam ser elucidados. Esses achados podem contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos em NICs e CC, bem como, no direcionamento de estudos futuros que busquem validar as hipóteses aqui levantadas.

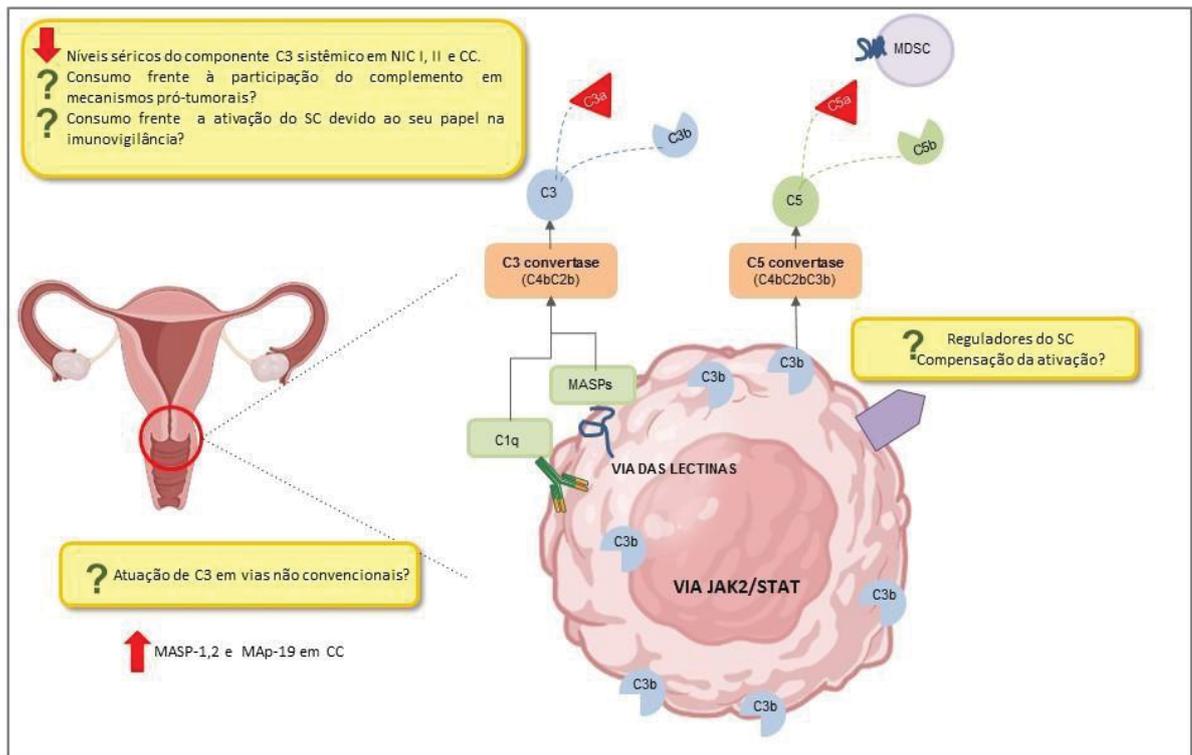


Figura 3. Participação do SC em NICs e CC

Evidências apoiam a participação do SC em NICs e CC. A deposição de C1q e produtos de clivagem de C3 (C3b, iC3b, C3c) foram observados no tecido tumoral em modelo de camundongo com CC (MARKIEWSKI et al., 2008). Adicionalmente, níveis séricos elevados de MASP-2, MASP-1 e MASP-19 em pacientes com CC indicam o envolvimento da VL na tumorigênese (MAESTRI et al., 2018). O fragmento C3b produzido durante a ativação do SC, é componente da C5 convertase, um complexo enzimático que cliva C5 produzindo C5a uma potente anafilotoxina relacionada a funções pró-tumorais em diversos estudos, incluindo modelo animal de CC (AJONA et al., 2017; MARKIEWSKI et al., 2008). As evidências geradas em estudos anteriores e as aqui obtidas no presente estudo indicam que C3 pode ter um papel na fisiopatologia de NIC e no CC, contribuindo em processos pró-tumorais, embora os níveis reduzidos de C3 possam resultar, em parte, da ativação do SC devido ao seu papel na imunovigilância de células tumorais e das alterações no epitélio de NICs. A ausência de impacto nos níveis séricos de C5a em pacientes com NICs e CC pode indicar a expressão de reguladores do SC por células tumorais, bem como, a atuação de C3 em vias não convencionais, entretanto, essas hipóteses ainda precisam ser elucidadas. Estudos adicionais envolvendo o componente C3 e C5a em pacientes com NIC e CC são necessários para validar essas hipóteses.

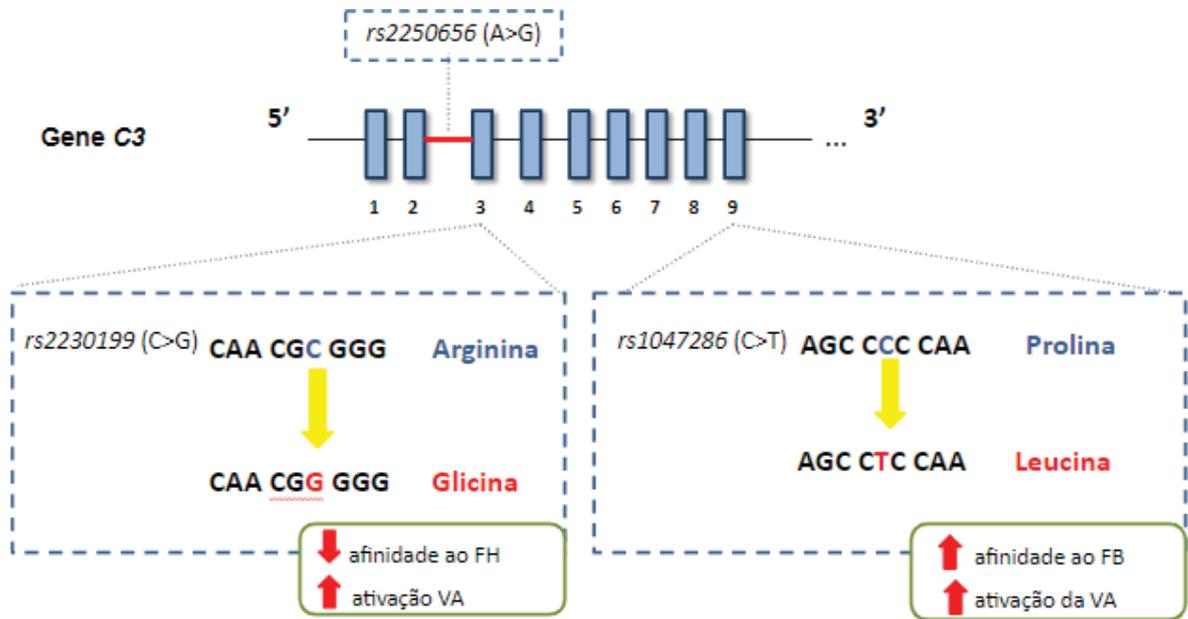


Figura 1. Localização dos polimorfismos do gene C3.

O SNP rs2230199 (C>G) resulta na substituição do aminoácido arginina carregada positivamente por glicina neutra, reduzindo a capacidade de ligação da proteína reguladora FH e consequentemente associada a maior ativação da via alternativa (HEURICH et al. 2011). O SNP rs1047286 (C>T) resulta na substituição do aminoácido prolina por leucina, ocasionando maior afinidade para FB, e relacionada à maior ativação da VA (ABRERA-ABELEDA et al. 2011; HEURICH et al. 2011). Os SNPs avaliados neste trabalho não estão relacionados a NIC ou CC.

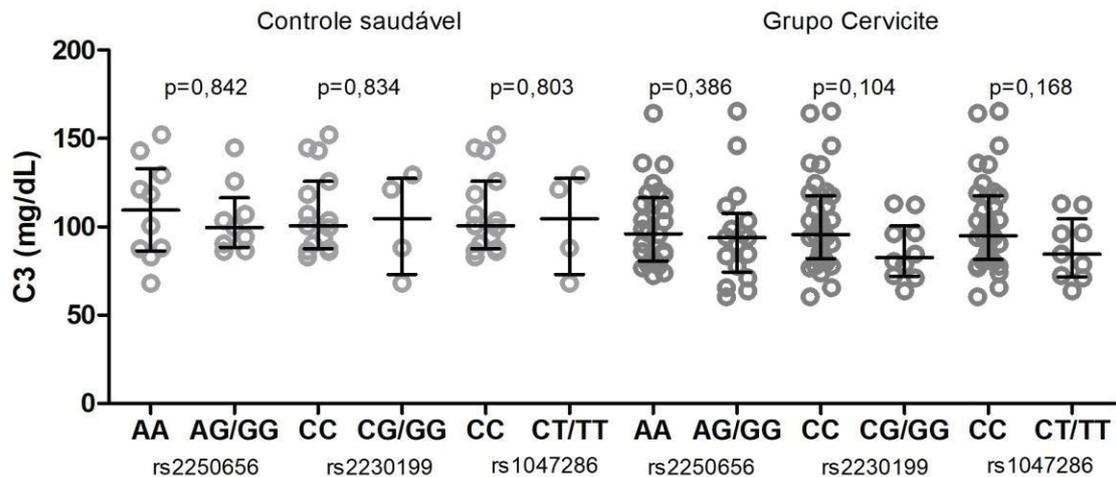


Figura 2. Concentração de C3 com relação aos SNPs de C3 nos grupos controle saudável e cervicite.

REFERÊNCIAS

ABRERA-ABELEDA, M. A. et al. Allelic variants of complement genes associated with dense deposit disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, n. 8, p. 1551–1559, 2011.

AFSHAR-KHARGHAN, V. The role of the complement system in cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 780–189, 2017.

AJONA, D.; ORTIZ-ESPINOSA, S.; PIO, R. Complement anaphylatoxins C3a and C5a: Emerging roles in cancer progression and treatment. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 85, p. 153–163, 2019.

BANDINI, S. et al. Early onset and enhanced growth of autochthonous mammary carcinomas in C3-deficient Her2/neu transgenic mice. **Oncolmunology**, v. 2, n. 9, p. 1–14, 2013.

BAYLY-JONES, C.; BUBECK, D.; DUNSTONE, M. A. The mystery behind membrane insertion: A review of the complement membrane attack complex. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1726, 2017.

BLOK, V. T. et al. A Bispecific Monoclonal Antibody Directed Against Both the Membrane-Bound Complement Regulator CD55 and the Renal Tumor-Associated Antigen G250 Enhances C3 Deposition and Tumor Cell Lysis by Complement. **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 7, p. 3437–3443, 1998.

BRAY, F. et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

CANALES, N. A. G. et al. A1BG and C3 are overexpressed in patients with cervical intraepithelial neoplasia III. **Oncology Letters**, v. 8, n. 2, p. 939–947, 2014.

CARDOZO, D. M. et al. Extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem de antígenos leucocitários humanos e de receptores semelhantes à imunoglobulina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 651–656, 2009.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **Journal of the National Cancer Institute**. Monographs, n. 31, p. 20–28, 2003.

CORRALES, L. et al. Anaphylatoxin C5a Creates a Favorable Microenvironment for Lung Cancer Progression. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 9, p. 4674–4683, 2012.

DOORBAR, J. et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, p. F55–F70, 2012.

DOWLING, P. et al. Analysis of acute-phase proteins, AHSG, C3, CLI, HP and SAA, reveals distinctive expression patterns associated with breast, colorectal and lung cancer. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 4, p. 911–923, 2012.

GRACIA, D. F. K. et al. Ficolin activation as a potential biomarker of the severity of schizophrenia. **Psychiatry Research**, v. 304, p. 114122, 2021.

GUNN, L. et al. Opposing Roles for Complement Component C5a in Tumor Progression and the Tumor Microenvironment. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 6, p. 2985–2994, 2015.

GUO, X.; HAO, Y.; KAMILIJIANG, M. Potential predictive plasma biomarkers for cervical cancer by 2D-DIGE proteomics and Ingenuity Pathway Analysis. **Tumor Biol.**, v. 36, n. 3, p. 1711–1720, 2014.

HEINEN, S. et al. Factor H – related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. **Immunobiology**, v. 114, n. 12, p. 2439–2448, 2016.

HEURICH, M. et al. Common polymorphisms in C3, factor B, and factor H collaborate to determine systemic complement activity and disease risk. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 21, p. 8761–8766, 24 mai. 2011.

JEONG, D. H. et al. Plasma proteomic analysis of patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Journal of Gynecologic Oncology**, v. 19, n. 3, p.173, 2008.

KIM, D.-Y. et al. Expression of complement protein C5a in a murine mammary cancer model: tumor regression by interference with the cell cycle. **Cancer Immunol Immunother**, v. 54, n. 10, p. 1026–1037, 2005.

KONDOS, S. C. et al. The structure and function of mammalian membrane-attack complex/perforin-like proteins. **Tissue Antigens**, v. 76, n. 5, p. 341–351, 2010.

LAUSEN, M. et al. Complement C3 opsonization of Chlamydia trachomatis facilitates uptake in human monocytes. **Microbes and Infection**, v. 20, n. 6, p. 328–336, 2018.

LEWIS, L. A.; RAM, S. Complement interactions with the pathogenic Neisseriae: clinical features , deficiency states , and evasion mechanisms. **FEBS Letters**, v. 594, n. 16, p. 1–25, 2020.

LIN, K. et al. Complement component 3 is a prognostic factor of non-small cell lung cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 10, n. 2, p. 811–817, 2014.

MAESTRI, C. A. et al. Mannose-binding lectin does not act as a biomarker for the progression of preinvasive lesions of invasive cervical cancer. **Medical Principles and Practice**, v. 26, n. 6, p. 530–534, 2017.

MAESTRI, C. A. et al. MASP-1 and MASP-2 Serum Levels Are Associated With Worse Prognostic in Cervical Cancer Progression. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2742, 2018.

MARKIEWSKI, M. M. et al. Modulation of the antitumor immune response by complement. **Nature Immunology**, v. 9, n. 11, p. 1225–1235, 2008.

ORTIZ-DE LA TABLA, V.; GUTIÉRREZ, F. Cervicitis: Etiology, diagnosis and treatment. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English ed.)**, v. 37, n. 10, p. 661–667, 2019.

PIAO, C. et al. Complement 5a enhances hepatic metastases of colon cancer via monocyte chemoattractant protein-1-mediated inflammatory cell infiltration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 17, p. 10667–10676, 2015.

REIS, E. S. et al. Complement in cancer: Untangling an intricate relationship. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2017.

REVEL, M. et al. Complement System: Promoter or Suppressor of Cancer Progression? **Antibodies**, v. 9, n. 4, p. 57, 2020.

RICKLIN, D. et al. Complement component C3 – The “Swiss Army Knife” of innate immunity and host defense. **Immunological Reviews**, v. 274, n. 1, p. 33–58, 1 nov. 2016.

RICKLIN, D. et al. Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, v. 11, n. 9, p. 785–797, 2010.

RODRIGUEZ, E. et al. A revised mechanism for the activation of complement C3 to C3b: A molecular explanation of a disease-associated polymorphism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 4, p. 2334–2350, 2015.

ROOSTAEI, T. et al. Convergent effects of a functional C3 variant on brain atrophy, demyelination, and cognitive impairment in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 25, n. 4, p. 532–540, 1 abr. 2019.

SCHIFFMAN, M. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 1–20, 1 dez. 2016.

SENA, L. et al. C3 Gene Functional Polymorphisms and C3 Serum Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Immunological Investigations**, v. 50, n. 8, p. 1027–1041, 2020.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TÖRN, C. et al. Complement gene variants in relation to autoantibodies to beta cell specific antigens and type 1 diabetes in the TEDDY Study. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–10, 2016.

YATES, J. R. W. et al. Complement C3 Variant and the Risk of Age-Related Macular Degeneration. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 6, p. 553–561, 9 ago. 2007.

YEKTA, R. F. et al. Decreased apolipoprotein A4 and increased complement component 3 as potential markers for papillary thyroid carcinoma: A proteomic study. **International Journal of Biological Markers**, v. 33, n. 4, p. 455–462, 2018.

YUAN, K. et al. Complement C3 overexpression activates JAK2 / STAT3 pathway and correlates with gastric cancer progression. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 39, n. 3, p. 1–15, 2020.

ZHOU, Z.-W. et al. From Microbiome to Inflammation: The Key Drivers of Cervical Cancer. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1–15, 2021.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo avaliar a possível associação entre polimorfismos do gene C3 e o CC, bem como entre as concentrações dos componentes C3 e C5a do SC em mulheres com lesões cervicais pré-invasivas (NIC I, NIC II) e CC. Os resultados sugerem que o componente C3 do SC tem um papel na imunopatologia de lesões cervicais pré-invasivas (NIC I, NIC II) e CC. Mulheres diagnosticadas com NIC I, NIC II e CC apresentaram redução significativa nos níveis séricos de C3 quando comparadas aos controles saudáveis, indicando seu consumo frente a ativação do complemento no processo da doença. Por outro lado, os níveis de C5a bem como os polimorfismos do gene C3 não foram relacionados as NIC ou CC. A ausência de impacto nos níveis séricos de C5a em pacientes com NICs e CC pode indicar a expressão de reguladores do SC por células tumorais, bem como, a atuação de C3 em vias não convencionais, os quais ainda precisam ser elucidados. Os polimorfismos rs2230199: C>G [p.Arg102Gly] e rs1047286: C>T [p.Pro314Leu] selecionados para o presente estudo afetam a estrutura proteica de C3b, impactando na ativação do SC. Nossos resultados indicam que a possível atuação de C3 no CC seria independente desses polimorfismos.

Este estudo apresenta algumas limitações, especialmente o baixo tamanho amostral nos grupos NIC I, NIC II, CC e controle saudável avaliados para quantificação do C3 e C5a, o que pode ter impactado nos resultados obtidos. Além disso, as amostras não possuem genotipagem para os principais tipos de HPVs oncogênicos (HPV16 e HPV18), o que seria importante para melhor caracterização do grupo controle, bem como para classificação de pacientes com maior risco de progressão da doença. A pandemia do Covid-19 dificultou o acesso aos hospitais, e conseqüentemente a coleta de amostras para aumento do número amostral. Dado as limitações apresentadas, consideramos que o presente estudo obteve resultados preliminares, que devem ser interpretados com cuidado e confirmados em estudos futuros.

Nossos achados podem contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos imunes envolvidos em NICs e CC, bem como no direcionamento de futuras pesquisas que visem validar as hipóteses aqui levantadas e o possível valor prognóstico de C3 e C5a.

6 CONCLUSÕES

- Os polimorfismos rs2250656, rs2230199 e rs1047286 do gene C3 não foram associados com o câncer cervical;
- Não houve associação entre os polimorfismos rs2250656, rs2230199 e rs1047286 do gene C3 e os tipos histológicos de câncer cervical: adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas;
- Houve redução significativa da concentração sérica do componente C3 em mulheres com NIC I, NIC II e NIC I/ II e câncer cervical;
- Os níveis séricos do componente C5a não foram significativamente diferentes entre os grupos avaliados.

REFERÊNCIAS

- ABBAS; LICHTMAN; PILLAI. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier; 8. ed, 2015.
- ADRIANI, K. S. et al. Common polymorphisms in the complement system and susceptibility to bacterial meningitis. **Journal of Infection**, v. 66, n. 3, p. 255–262, 2013.
- AFSHAR-KHARGHAN, V. The role of the complement system in cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 780–189, 2017.
- AJONA, D. et al. Investigation of complement activation product C4d as a diagnostic and prognostic biomarker for lung cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, 2013.
- AJONA, D.; ORTIZ-ESPINOSA, S.; PIO, R. Complement anaphylatoxins C3a and C5a: Emerging roles in cancer progression and treatment. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 85, p. 153–163, 2019.
- BANDINI, S. et al. Early onset and enhanced growth of autochthonous mammary carcinomas in C3-deficient Her2/neu transgenic mice. **Oncology**, v. 2, n. 9, p. 1–14, 2013.
- BAYLY-JONES, C.; BUBECK, D.; DUNSTONE, M. A. The mystery behind membrane insertion: A review of the complement membrane attack complex. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1726, 2017.
- BERRAONDO, P. et al. Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance. **Immunological Reviews**, v. 274, n. 1, p. 290–306, 2016.
- BLOK, V. T. et al. A Bispecific Monoclonal Antibody Directed Against Both the Membrane-Bound Complement Regulator CD55 and the Renal Tumor-Associated Antigen G250 Enhances C3 Deposition and Tumor Cell Lysis by Complement. **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 7, p. 3437–3443, 1998.
- BOSCH, F. X. et al. Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases. **Vaccine**, v. 31, p. 1–31, 2013.
- BOSCH, F. X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, n. 4, p. 244–265, 2002.
- BOTTO, M. Molecular basis of polymorphisms of human complement component C3. **Journal of Experimental Medicine**, v. 172, n. 4, p. 1011–1017, 1990.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Imagens das campanhas educativas de prevenção do câncer do colo de útero no Brasil**. [s. l.]: Instituto Nacional do Câncer / Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), 2011. Catálogo de exposição derivado do Projeto História do Câncer - atores, cenários e políticas públicas.

BRAY, F. et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BRIANTI, P.; DE FLAMMINEIS, E.; MERCURI, S. R. Review of HPV-related diseases and cancers. **New Microbiologica**, v. 40, n. 2, p. 80–85, 2017.

CANALES, N. A. G. et al. A1BG and C3 are overexpressed in patients with cervical intraepithelial neoplasia III. **Oncology Letters**, v. 8, n. 2, p. 939–947, 2014.

CANFELL, K. et al. Mortality impact of achieving WHO cervical cancer elimination targets: a comparative modelling analysis in 78 low-income and lower-middle-income countries. **The Lancet**, v. 395, n. 10224, p. 591–603, 2020.

CANFELL, K. Towards the global elimination of cervical cancer. **Papillomavirus Research**, v. 8, 1 dez. 2019.

CARVALHO, M. C. DE M. P.; QUEIROZ, A. B. A. Lesões precursoras do câncer cervicouterino: evolução histórica e subsídios para consulta de enfermagem ginecológica. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 14, n. 3, p. 617–624, 2010.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **Journal of the National Cancer Institute**, n. 31, p. 20–28, 2003.

CASTLE, P. E. et al. Treatment of cervical intraepithelial lesions. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 138, p. 20–25, 2017

CHEN, J. et al. Profiling the potential tumor markers of pancreatic ductal adenocarcinoma using 2D-DIGE and MALDI-TOF-MS: Up-regulation of Complement C3 and alpha-2-HS-glycoprotein. **Pancreatology**, v. 13, n. 3, p. 290–297, 2013.

COULTHARD, L. G.; WOODRUFF, T. M. Is the Complement Activation Product C3a a Proinflammatory Molecule? Re-evaluating the Evidence and the Myth. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 8, p. 3542–3548, 15 abr. 2015.

CRUZ, L. M. B. DA; LOUREIRO, R. P. A Comunicação na Abordagem Preventiva do Câncer do Colo do Útero: importância das influências histórico-culturais e da sexualidade feminina na adesão às campanhas. **Saúde e Sociedade**, v. 17, n. 2, p. 120–131, 2008.

DE VRIES RR; MEERA KHAN P; BERNINI LF; VAN LOGHEM E; VAN ROOD JJ. Genetic control of survival in epidemics. **J Immunogenet**, v. 6, n. 4, p. 271–287, 1979.

DELANGHE, J. R.; SPEECKAERT, R.; SPEECKAERT, M. M. Complement C3 and its polymorphism: Biological and clinical consequences. **Pathology**, v. 46, n. 1, p. 1–10, 2014.

DENG, H. et al. HPV16-Immortalized Cells from Human Transformation Zone and Endocervix are More Dysplastic than Ectocervical Cells in Organotypic Culture. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

DOORBAR, J. et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, p. F55–F70, 2012.

DOWLING, P. et al. Analysis of acute-phase proteins, AHSG, C3, CLI, HP and SAA, reveals distinctive expression patterns associated with breast, colorectal and lung cancer. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 4, p. 911–923, 2012.

FACCIABENE, A. et al. Local endothelial complement activation reverses endothelial quiescence, enabling t-cell homing, and tumor control during t-cell immunotherapy. **Oncotarget**, v. 6, n. 9, p. 1–15, 2017.

FEINBERG, A. P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 1, p. 21–33, 2006.

GELLER, A.; YAN, J. The role of membrane bound complement regulatory proteins in tumor development and cancer immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, p. 1–13, 2019.

GRAVITT, P. E.; WINER, R. L. Natural history of HPV infection across the lifespan: Role of viral latency. **Viruses**, v. 9, n. 10, p. 1–10, 2017.

HANAS, J. S. et al. Biomarker identification in human pancreatic cancer sera. **Pancreas**, v. 36, n. 1, p. 61–69, 2008.

HEURICH, M. et al. Common polymorphisms in C3, factor B, and factor H collaborate to determine systemic complement activity and disease risk. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 21, p. 8761–8766, 2011.

HOWARD, M.; FARRAR, C. A.; SACKS, S. H. Structural and functional diversity of collectins and ficolins and their relationship to disease. **Seminars in Immunopathology**, v. 40, n. 1, p. 75–85, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA – INCA. Conceito e Magnitude. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-do-colo-do-utero/conceito-e-magnitude>. Acesso em: 10 fev. 2022a.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA – INCA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – 6. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA – INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA – INCA. Existe vacina contra o HPV?: perguntas frequentes. 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/perguntas-frequentes/existe-vacina-contr-o-hpv>. Acesso em: 31 dez. 2021.

JANSSEN, B. J. C. et al. Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. **Nature**, v. 444, n. 7116, p. 213–216, 2006.

JENKINS, DAVID. Chapter 1 - A Brief History of Cervical Cancer. Human Papillomavirus: proving and using a viral cause for cancer. London: Elsevier, 2020. Cap. 1. p. 1-12.

JEONG, D. H. et al. Plasma proteomic analysis of patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Journal of Gynecologic Oncology**, v. 19, n. 3, p.173, 2008.

KOCH, C.; BEHRENDT, N. A novel polymorphism of human complement component C3 detected by means of a monoclonal antibody. **Immunogenetics**, v. 23, n. 5, p. 322–325, 1986.

KONDOS, S. C. et al. The structure and function of mammalian membrane-attack complex/perforin-like proteins. **Tissue Antigens**, v. 76, n. 5, p. 341–351, 2010.

KOURTZELIS, I.; RAFAIL, S. The dual role of complement in cancer and its implication in anti-tumor therapy. **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 14, p. 1–14, 2016.

KWAK, J. W. et al. Complement activation via a C3a receptor pathway alters CD4+ T lymphocytes and mediates lung cancer progression. **Cancer Research**, v. 78, n. 1, p. 143–156, 2017.

LI, F. et al. Photodynamic therapy boosts anti-glioma immunity in mice: A dependence on the activities of T cells and complement C3. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 10, p. 3035–3043, 2011.

LIN, K. et al. Complement component 3 is a prognostic factor of non-small cell lung cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 10, n. 2, p. 811–817, 2014.

LÖWY, I. Cancer, women, and public health: the history of screening for cervical cancer. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, v. 17, n. 1, p. 53–67, 2010.

LU, Y.; HU, X. B. C5a stimulates the proliferation of breast cancer cells via Akt-dependent RGC-32 gene activation. **Oncology Reports**, v. 32, n. 6, p. 2817–2823, 2014.

ŁUKAWSKA, E.; POLCYN-ADAMCZAK, M.; NIEMIR, Z. I. The role of the alternative pathway of complement activation in glomerular diseases. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 18, n. 3, p. 297-318, 2018.

MARKIEWSKI, M. M. et al. Modulation of the antitumor immune response by complement. **Nature Immunology**, v. 9, n. 11, p. 1225–1235, 2008.

MERLE, N. S. et al. Complement system part I – molecular mechanisms of activation and regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 262, p. 1–30, 2015.

MORENO, V. et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection : the IARC multicentric case- control study. **The**

NUNEZ-CRUZ, S. et al. Genetic and Pharmacologic Inhibition of Complement Impairs Endothelial Cell Function and Ablates Ovarian Cancer Neovascularization. **Neoplasia**, v. 14, n. 11, p. 994–1004, 2012.

NURSE KEY. The cervix. 2020. Disponível em: <https://nursekey.com/>. Acesso em: 24 jul. 2020.

OLIVEIRA, L. C. DE et al. Frequência de polimorfismo de nucleotídeo único de alguns genes da resposta imune em amostra populacional da cidade de São Paulo, Brasil. **Enstein**, v. 9, p. 359–366, 2011.

OPAS. Controle integral do câncer do colo do útero. Guia de práticas essenciais. Washington, DC: OPAS, 2016. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/31403/9789275718797-%20por.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 07 dez. 2021.

ORIOLE SUNYER, J.; ZARKADIS, I. K.; LAMBRIS, J. D. Complement diversity: A mechanism for generating immune diversity? **Immunology Today**, v. 19, n. 11, p. 519–523, 1998.

PIO, R.; AJONA, D.; LAMBRIS, J. D. Complement inhibition in cancer therapy. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 1, p. 54–64, 2013.

PIO, R.; AJONA, D.; LAMBRIS, J. D. Complement inhibition in cancer therapy. **Seminars in Immunology**, v. 25, p. 54–64, 2013.

PRENDIVILLE, W.; SANKARANARAYANAN, R. **Colposcopy and treatment of cervical precancer**. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017

QUADROS, A. U.; CUNHA, T. M. C5a and pain development: An old molecule, a new target. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 58–67, 2016.

REIS, E. S. et al. Complement in cancer: Untangling an intricate relationship. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2017.

REVEL, M. et al. Complement System: Promoter or Suppressor of Cancer Progression? **Antibodies**, v. 9, n. 4, p. 57, 2020.

REYNOLDS, L. A.; TANSEY, E. M. History of cervical cancer and the role of the human papillomavirus, 1960-2000. London: Wellcome Trust Centre for the History of Medicine at UCL, 2009.

RICKLIN, D. et al. Complement component C3 – The “Swiss Army Knife” of innate immunity and host defense. **Immunological Reviews**, v. 274, n. 1, p. 33–58, 2016.

RICKLIN, D. et al. Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, v. 11, n. 9, p. 785–797, 2010.

ROOSTAEI, T. et al. Convergent effects of a functional C3 variant on brain atrophy, demyelination, and cognitive impairment in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 25, n. 4, p. 532–540, 2019.

RS, A. H.; RAMAKRISHNAN, V. Cancer Science & Research: Open Access A review of risk factors in the development of cervical malignancy. **Cancer Science & Research: Open Access**, p. 1–4, 2016.

SAHU, A.; LAMBRIS, J. D. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. **Immunological Reviews**, v. 180, n. 4, p. 35–48, 2001.

SCHIFFMAN, M. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 1–20, 1 dez. 2016.

SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 22, n. 4, p. 553–560, 2013.

SUADICANI, P.; HEIN, H. O.; GYNTELBERG, F. Complement C3 Genotype Variants and Risk of Lung Cancer Mortality. **ISRN Pulmonology**, v. 2011, p. 1–4, 2011.

TEIXEIRA, L. A. From gynaecology offices to screening campaigns: A brief history of cervical cancer prevention in Brazil. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, v. 22, n. 1, 2015.

TERMINI, L.; VILLA, L. Biomarcadores na triagem do câncer do colo uterino. **DST - Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis**, v. 20, n. 2, p. 125–131, 2008.

TICHACZEK-GOSKA, D. Deficiencies and excessive human complement system activation in disorders of multifarious etiology. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 21, n. 1, p. 105–114, 2012.

TÖRN, C. et al. Complement gene variants in relation to autoantibodies to beta cell specific antigens and type 1 diabetes in the TEDDY Study. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

TOTA, J. E. et al. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: Implications for prevention strategies. **Preventive Medicine**, v. 53, n. SUPPL. 1, p. S12–S21, 2011.

TROUW, L. A.; PICKERING, M. C.; BLOM, A. M. The complement system as a potential therapeutic target in rheumatic disease. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 9, p. 538–547, 2017b.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017

WEIME, R. J.; DEMEULENAERE, L. Genetically determined electrophoretic variant of the human complement component C₃. **Nature**, v. 214, 1967.

WHO. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. World Health Organization. 2020. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer). Acesso em: 08 dez. 2021.

YATES, J. R. W. et al. Complement C3 Variant and the Risk of Age-Related Macular. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 6, p. 553–561, 2007.

YEKTA, R. F. et al. Decreased apolipoprotein A4 and increased complement component 3 as potential markers for papillary thyroid carcinoma: A proteomic study. **International Journal of Biological Markers**, v. 33, n. 4, p. 455–462, 2018.

YUAN, K. et al. Complement C3 overexpression activates JAK2 / STAT3 pathway and correlates with gastric cancer progression. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 39, n. 3, p. 1–15, 2020.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260–265, 2009.

APÊNDICE 1 – FICHA CADASTRAL

FICHA CADASTRAL

ID laboratório _____ Data da coleta de dados _____

Nome _____

Idade _____ Data de nascimento: _____ Estado civil: _____

Etnia () Branco () Negro () Asiático () Indígena Conhecimento sobre HPV () Sim () Não

Renda Mensal () 1 SM () 1-3 SM () 3-5 SM () >5 SM (SM = salário mínimo)

Escolaridade () FI () FC () MI () MC () SI () SC Suspeita diagnóstica

Nº de gestações _____ Idade ao 1º parto _____ Abortos: () Não () Sim _____

1ª relação sexual _____ Nº parceiros sexuais _____ Nº parceiros últimos 6 meses _____

Anticoncepcional () Não () Sim _____ Tempo de uso _____ Idade de início _____

Usuária de DIU? () Não () Sim – Tempo de uso _____

Uso de preservativo () Sempre () Às vezes () Nunca

Laqueadura () Não () Sim – Idade _____ Menopausa () Não () Sim – Idade _____

Fumante? () Não () Sim – Quanto tempo? _____ Nº de cigarros/dia _____

Ex-fumante, há quanto tempo parou? _____ Durante quanto tempo fumou? _____

Antecedentes de DST () Não () Sim Qual? _____

Antecedentes de doenças autoimunes () Não () Sim Qual? _____

Familiares com doenças autoimunes _____

Antecedentes de alergias () Não () Sim Qual? _____

Outras doenças () Não () Sim Qual? _____

Uso de medicamentos (contínuo) () Não () Sim Qual? _____

Uso de corticoides no momento da coleta () Não () Sim Qual _____

Tempo de uso do corticoide _____

Uso de pomada ginecológica no momento da coleta () Não () Sim Qual _____

Cauterização prévia () Não () Sim - () Colo () Vagina () Vulva () Anus

Realiza o preventivo anualmente () Não () Sim Último preventivo _____

Vacinação contra HPV () Sim () Não Data _____

Antecedentes de câncer () Não () Sim Qual _____ Idade ao diagnóstico _____

Tempo de tratamento _____ Tipo de Tratamento _____

Familiares com câncer (Quem? Tipo?) _____

Antecedentes de Transfusão Sanguínea () Não () Sim

Peso _____ Altura _____ Jejum () Não () Sim

Atividade Física (regular) () Não () Sim Tipo/ Frequência _____

Atividade Física (horas antes da coleta) () Não () Sim Tipo _____

Estado Geral _____ () Gripada () Em uso de antibiótico () Febre (últimas 48h)

Materiais Secreção () Sim () Não Plasma () Sim () Não Soro () Sim () Não

APÊNDICE 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está convidada a participar do estudo intitulado “Análise genética e de proteínas do sistema imune inato em pacientes com lesão intraepithelial cervical ou câncer do colo do útero”. Para que você possa decidir se aceita ou não participar, esse termo fornece algumas informações.

1. O objetivo do estudo é analisar se existem alterações no seu DNA (ou outro material genético) ou em componentes que fazem parte do seu sistema imunológico inato e que poderiam influenciar no desenvolvimento de lesões e câncer do colo do útero. Sabemos que o vírus HPV pode causar essa doença, por isso pretendemos investigar também o tipo de HPV que levou ao seu desenvolvimento.
2. Para realizar esse estudo, pretendemos fazer algumas perguntas para você e verificar seus dados e informações no prontuário. Gostaríamos de coletar seu sangue para realizar testes laboratoriais, como analisar partes do seu DNA e proteínas relacionadas com o sistema imunológico inato. Para tal, pretendemos utilizar também blocos de amostras biológicas (amostras de biópsias ou tumor) e/ou escova endocervical coletada durante exame preventivo, caso você tenha sido submetida a algum procedimento padrão no Hospital Erasto Gaertner para extração dos mesmos.
3. A coleta de sangue será realizada por punção periférica da veia do antebraço. Os desconfortos da coleta de sangue estão relacionados à própria punção da veia, incluindo dor leve e, eventualmente, hematomas. Caso haja alguma complicação durante e após a coleta, nos responsabilizamos para atendê-la e fornecer os cuidados necessários.
4. Não haverá benefício direto para você, pois se trata de um estudo experimental. Entretanto, acreditamos que por meio desse estudo poderemos conhecer melhor fatores que poderiam influenciar no desenvolvimento do câncer do colo do útero.
5. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são Camila de Freitas Oliveira, que pode ser encontrado no endereço Rua General Carneiro, 181 ou pelo telefone (41) 3360-1800 (ramal 6537) e Fernanda Costa Brandão Berti, que pode ser encontrado no endereço Av. Cel. Francisco H. dos Santos, 100 ou pelo telefone (41) 3361-1724.
6. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CÉP), no Hospital Erasto Gaertner– R Dr. Ovan de Amaral, 201. – Bairro Jardim das Américas – Fone: (41) 3361-5271.
7. Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo no seu tratamento na Instituição.
8. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outras pacientes. Não iremos divulgar seu nome quando os resultados do estudo forem publicados.

9. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados do estudo. Para tal, você pode entrar em contato com o investigador principal (endereço e telefone já foram mencionados acima).

10. Não há despesas pessoais para você em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

11. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), você tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

12. Os dados e o material coletado serão utilizados para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Análise genética e de proteínas do sistema imune inato em pacientes com lesão intraepitelial cervical ou câncer do colo do útero”.

Eu discuti com a Sra. Camila de Freitas Oliveira e/ou Sra. Fernanda Costa Brandão Berti, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

 Assinatura do paciente/representante legal do - / /
 Data

 Assinatura da testemunha - / /
 Data

 Assinatura do Pesquisador - / /
 Data

ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise genética e de proteínas do sistema imune inato em pacientes com lesão intra-epitelial cervical ou câncer do colo do útero

Pesquisador: Stefanie Epp Boschmann

Área Temática: Genética Humana;
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 4

CAAE: 62542616.7.0000.0098

Instituição Proponente: Hospital Erasto Gaertner

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.835.307

Apresentação do Projeto:

Introdução:

O Papilomavírus humano (HPV) é responsável pela infecção viral mais comum do sistema reprodutivo. Entre os mais de 150 tipos de HPV conhecidos, aproximadamente 40 podem infectar o trato ano-genital e pelo menos 13 são oncogênicos. A transmissão ocorre principalmente por meio do contato sexual e a infecção pelo HPV, pouco depois do contato. Acredita-se que a maioria das mulheres e homens sexualmente ativos será infectada por este vírus em algum momento da vida (WHO, 2015). Apesar da alta incidência de infecções pelo HPV, cerca de 90% dos casos regride espontaneamente em até 2 anos sem alguma intervenção. Uma proporção pequena de infecções com determinados tipos de HPV (principalmente do tipo 16 e 18) podem persistir e causar lesões pré-cancerosas que, se não tratadas, evoluem para câncer. O câncer do colo do útero, também chamado de câncer cervical, é a doença relacionada ao HPV mais comum. Aproximadamente 99,7% dos casos de câncer cervical são causados por este vírus (WHO, 2015). Em 2012, cerca de 270.000 mulheres morreram de câncer do colo do útero ao redor do mundo, sendo que 85% dos óbitos ocorreram em países com baixa ou média renda, onde foram estimados 445.000 casos novos neste mesmo ano (WHO, 2015). No Brasil, foram registrados 5.430 óbitos por esse tipo de câncer em 2013, o que representa uma taxa de mortalidade de 4,86 óbitos para cada 100 mil mulheres,

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas **CEP:** 81.520-060
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3361-5271 **E-mail:** cep@erastogaertner.com.br



HOSPITAL ERASTO
GAERTNER - LIGA
PARANAENSE DE COMBATE



Continuação do Parecer: 2.835.307

(conhecidos como PAMPs), ou a padrões glicolizados aberrantes em células apoptóticas, necróticas ou malignas (também conhecidos como DAMPs) (RICKLIN et al., 2010). Devido à importância do sistema complemento na defesa do organismo à entrada de patógenos, na eliminação de células apoptóticas, necróticas e malignas, diversos estudos já foram realizados para investigar a sua influência na susceptibilidade e na progressão de diversas doenças infecciosas, autoimunes e em diversos tipos de câncer. Polimorfismos genéticos e variações nas concentrações de proteínas da via das lectinas foram associados à Doença de Chagas, Hanseníase, Artrite Reumatoide, Febre Reumática, Malária, infecção pelo vírus da Hepatite C, entre outras doenças (LUZ et al., 2016; BOLDT et al., 2013; 2009; GOELDNER et al., 2014; CATARINO et al., 2014; TULLIO et al., 2011). Em pacientes infectadas pelo HPV e com lesões NIC 3, observou-se uma expressão aumentada da proteína C3 do complemento (CANALES et al., 2014). Já em pacientes com câncer colorretal, a proteína MASP-2 da via das lectinas foi descrita como um bom marcador para recidiva e pior prognóstico (YTTING et al., 2005; 2008). Estudos recentes sugerem que o sistema complemento desempenha um papel duplo no desenvolvimento do câncer. Por um lado, pode auxiliar na destruição do câncer, mas por outro, pode promover o desenvolvimento tumoral em certas condições inflamatórias (MAMIDI et al., 2015). Segundo Del Toro-Arreola et al. (2015), uma melhor compreensão sobre a relação entre fatores virais e imunológicos poderia fornecer informações importantes para o desenvolvimento de vacinas profiláticas e terapêuticas contra o HPV associado ao câncer cervical. Imunoterapêuticos e imunomoduladores poderiam aumentar a resposta celular específica para o HPV. Estes imunomoduladores poderiam incluir receptores toll-like para ativar a imunidade inata, adjuvantes para aumentar a resposta imune adaptativa e imunomoduladores para induzir mecanismos de imunossupressão tumoral (VAN DE WALL et al., 2014). Portanto, percebe-se a necessidade de estudos de associação para investigar e esclarecer o papel do sistema imune inato na susceptibilidade e no desenvolvimento de lesões precursoras e, conseqüentemente, do câncer do colo uterino.

Hipótese:

Acredito que polimorfismos genéticos, distintos perfis de expressão de ncRNAs e alterações na expressão de proteínas do sistema imune inato podem influenciar na susceptibilidade e no desenvolvimento de lesões intra-epiteliais e de câncer do colo uterino em mulheres infectadas por HPV.

Metodologia:

Endereço: Rua Dr. Ovide de Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas CEP: 81.520-060
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3361-5271 E-mail: cep@erastogaertner.com.br



HOSPITAL ERASTO
GAERTNER - LIGA
PARANAENSE DE COMBATE



Continuação do Parecer: 2.835.307

Pacientes com lesões cervicais precursoras ou com câncer do colo uterino, quando atendidas no consultório médico do Hospital Erasto Gaertner, serão convidadas a participar desse estudo. Após a consulta, será apresentado a elas o TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido) e serão incluídas apenas aquelas que estiverem de acordo com os critérios de inclusão e que concordarem em assinar o TCLE. As amostras de secreção cervical serão coletadas durante avaliação clínica, pelo (a) médico (a) ginecologista ou enfermeiro (a) que a acompanha, utilizando-se de escova endocervical (cytobrush). Após obtenção da amostra para encaminhamento ao exame citológico, a escova endocervical será armazenada em tubo falcon contendo 2mL de solução tampão Tris-EDTA (TE) (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA). Após avaliação clínica, os pesquisadores realizarão uma entrevista (modelo de questionário abaixo) e coleta de sangue das participantes em uma sala disponibilizada pelo Serviço de Ginecologia e Mama do Hospital Erasto Gaertner. Os materiais utilizados para a coleta serão fornecidos pelos próprios pesquisadores e, portanto, não serão utilizados recursos do hospital para tal. Pretende-se coletar 15 ml de sangue periférico: 10 ml em tubos contendo EDTA e 5 ml em tubos sem anticoagulante. O sangue coletado será levado ao Laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital de Clínicas - UFPR para posterior extração de material genético e análise molecular, bem como para separação do soro e plasma para análise de proteínas plasmáticas e/ou sorológicas por meio de ensaios imunoenzimáticos, como ELISA e TRIFMA. Em relação à amostra de secreção cervical, esta será levada ao Laboratório de Genética Molecular Humana – UFPR, onde será centrifugada, sendo o sobrenadante separado para posterior extração do material genético e análise molecular, bem como para posterior análise de proteínas por meio de ensaios imunoenzimáticos, como ELISA. A extração de DNA compreende o processo de lise celular, precipitação de proteínas, lise nuclear e ressuspensão do DNA. Após a extração, o DNA é hidratado e armazenado em congelador a temperatura de -20°C, pronto para uso. A quantificação e análise da pureza do DNA é realizada utilizando-se o NanoDrop (Thermo Scientific). Igualmente, será realizada extração de RNA (total e ncRNA) utilizando-se kits apropriados. A quantificação e análise da pureza do RNA será realizada também utilizando-se espectrofotometria no equipamento NanoDrop (Thermo Scientific). Pretendemos utilizar biópsias ou tecido tumoral parafinado do colo uterino (extraídos para avaliação anatomopatológica no Hospital Erasto Gaertner) para extração de material genético e análise molecular do mesmo, bem como para análise de proteínas, utilizando técnicas laboratoriais como, por exemplo, a imunistoquímica, imunofluorescência ou western-blot. Para análise molecular de genes do DNA genômico (extraído do sangue), de DNA tumoral e do vírus HPV, utilizaremos técnicas como a PCR-SSP, sequenciamento e/ou pirosequenciamento. Para caracterizar o perfil de ncRNA em

Endereço: Rua Dr. Ovande do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3361-5271

CEP: 81.520-060

E-mail: cep@erastogaertner.com.br



Continuação do Parecer: 2.835.307

plasma e secreção cervical, após extração de ncRNA será realizada a caracterização do perfil destes por Sequenciamento de Nova Geração (NGS), seguida por validação dos resultados por PCR em tempo real (qPCR). A coleta de dados das participantes do estudo será realizada por meio de um questionário e pesquisa em prontuários físicos e/ou eletrônicos. Pretendemos iniciar com a coleta de dados e de materiais logo após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar material genético e proteínas do sistema imune inato em mulheres com lesão intra-epitelial cervical ou câncer do colo do útero.



Continuação do Parecer: 2.835.307

plasma e secreção cervical, após extração de ncRNA será realizada a caracterização do perfil destes por Sequenciamento de Nova Geração (NGS), seguida por validação dos resultados por PCR em tempo real (qPCR). A coleta de dados das participantes do estudo será realizada por meio de um questionário e pesquisa em prontuários físicos e/ou eletrônicos. Pretendemos iniciar com a coleta de dados e de materiais logo após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar material genético e proteínas do sistema imune inato em mulheres com lesão intra-epitelial cervical ou câncer do colo do útero.

Objetivo Secundário:

Otimizar técnicas de PCR-SSP, sequenciamento e/ou pirosequenciamento para identificar polimorfismos e/ou sequências de genes do sistema imune inato; analisar RNA envolvido na síntese de proteínas do sistema imune inato e na regulação desse processo; quantificar proteínas do sistema imune inato; investigar a expressão de proteínas do sistema imune inato em tecidos de lesões ou tumores cervicais; investigar a presença e o tipo do Papilomavírus humano (HPV) em lesões ou tumores cervicais; comparar os genótipos com os fenótipos; comparar os genótipos e fenótipos com o tipo de HPV; comparar os genótipos e fenótipos entre as pacientes com diagnóstico NIC1, NIC2, NIC 3 e câncer do colo do útero; e caracterizar o perfil de RNAs não-codificadores (ncRNA) em plasma e secreção cervical de pacientes com diagnóstico NIC1, NIC2, NIC 3 e câncer do colo do útero, em busca de potenciais biomarcadores de diagnóstico e progressão da doença.

Objetivo da Emenda:

- Inserção de novos pesquisadores, incluindo: Camila de Freitas Oliveira, Fernanda Costa Brandão Berti, Danielle Malheiros Ferreira, Gabriel Adelman Cipolla, Karen Brajão de Oliveira e Helen Cristina Beckert.
- Inserção de objetivo específico adicional.
- Inclusão na metodologia de: Alteração de volume de sangue periférico coletado, pretendendo-se agora coletar 15 ml de sangue periférico.
- Alteração no cronograma.
- Alteração no orçamento.

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201	CEP: 81.520-060
Bairro: Jardim das Américas	
UF: PR	Município: CURITIBA
Telefone: (41)3361-5271	E-mail: cep@erastogaertner.com.br

Página 05 de 08



Continuação do Parecer: 2.635.307

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos:**

Haverá baixo risco para o grupo de pesquisa, relacionado à coleta de sangue. Porém, será oferecida assistência gratuita por um profissional de saúde caso haja alguma complicação. A coleta de secreção por sua vez, já é procedimento padrão realizada pela equipe responsável.

Benefícios:

Pretendemos através desse estudo ampliar o conhecimento sobre a relação entre o sistema imune inato e o desenvolvimento do câncer do colo uterino, bem como detectar possíveis biomarcadores para avaliar o risco, diagnóstico e/ou prognóstico da doença. Estudos de associação entre fatores imunológicos e virais poderiam fornecer informações importantes para o desenvolvimento de imunoterapêuticos e/ou imunomodulares, que visam aumentar a resposta imune contra o HPV.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para esta emenda nada consta.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos e considerações apresentados satisfatoriamente.

Recomendações:

Sem recomendações, emenda aprovada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda está de acordo conforme itens acima analisados, sem lista de inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Gostaríamos de informar que a emenda do projeto de pesquisa intitulado como: "Análise genética e de proteínas do sistema imune inato em pacientes com lesão intra-epitelial cervical ou câncer do colo do útero", cujo número de protocolo é P.P. nº 2557 e tem como pesquisador responsável V. Sa. Foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e foi Aprovado.

- Inserção de novos pesquisadores, incluindo: Camila de Freitas Oliveira, Fernanda Costa Brandão Berti, Danielle Malheiros Ferreira, Gabriel Adelman Cipolla, Karen Brajão de Oliveira e Helen Cristina Beckert.
- Inserção de objetivo específico adicional.
- Inclusão na metodologia de: Alteração de volume de sangue periférico coletado, pretendendo-se agora coletar 15 ml de sangue periférico.

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201	CEP: 81.520-060
Bairro: Jardim das Américas	
UF: PR Município: CURITIBA	
Telefone: (41)3361-5271	E-mail: cep@erastogaertner.com.br

Página 06 de 08



Continuação do Parecer: 2.835.307

- Alteração no cronograma.
- Alteração no orçamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1167913_E1.pdf	14/08/2018 12:01:54		Aceito
Declaração de Pesquisadores	JustificativaEmenda.docx	14/08/2018 11:46:16	Danielle Malheiros Ferreira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoEpp_Emenda_ProjetoOriginal.doc	01/08/2018 08:02:18	Danielle Malheiros Ferreira	Aceito
Cronograma	Cronograma_Emenda.pdf	05/07/2018 11:51:27	Danielle Malheiros Ferreira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	01/06/2017 10:31:56	Stefanie Epp Boschmann	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoResponsabilidadeOrientador.pdf	23/09/2016 16:57:16	Stefanie Epp Boschmann	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoResponsabilidadePesquisador.pdf	23/09/2016 16:56:30	Stefanie Epp Boschmann	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DeclaracaoUsoMaterialeDados.pdf	23/09/2016 16:55:45	Stefanie Epp Boschmann	Aceito

Diórbanco				
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoLIPMHC.pdf	23/09/2016 16:55:20	Stefanie Epp Boschmann	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoSAP.pdf	23/09/2016 16:54:56	Stefanie Epp Boschmann	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoHCUFPR.pdf	23/09/2016 16:54:31	Stefanie Epp Boschmann	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoHEG.pdf	23/09/2016 16:54:08	Stefanie Epp Boschmann	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	23/09/2016 16:48:25	Stefanie Epp Boschmann	Aceito

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201
 Bairro: Jardim das Américas CEP: 81.520-060
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3381-5271 E-mail: cep@erastogaertner.com.br

Página 07 de 08

 ERASTO GAERTNER <small>COMBATE O CÂNCER COM HUMANISMO, CÉNCIA E AFETO</small>	HOSPITAL ERASTO GAERTNER - LIGA PARANAENSE DE COMBATE	
---	--	---

Continuação do Parecer: 2.835.307

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 22 de Agosto de 2018

Assinado por:
 Jordan Zanetti Silva
 (Coordenador)