

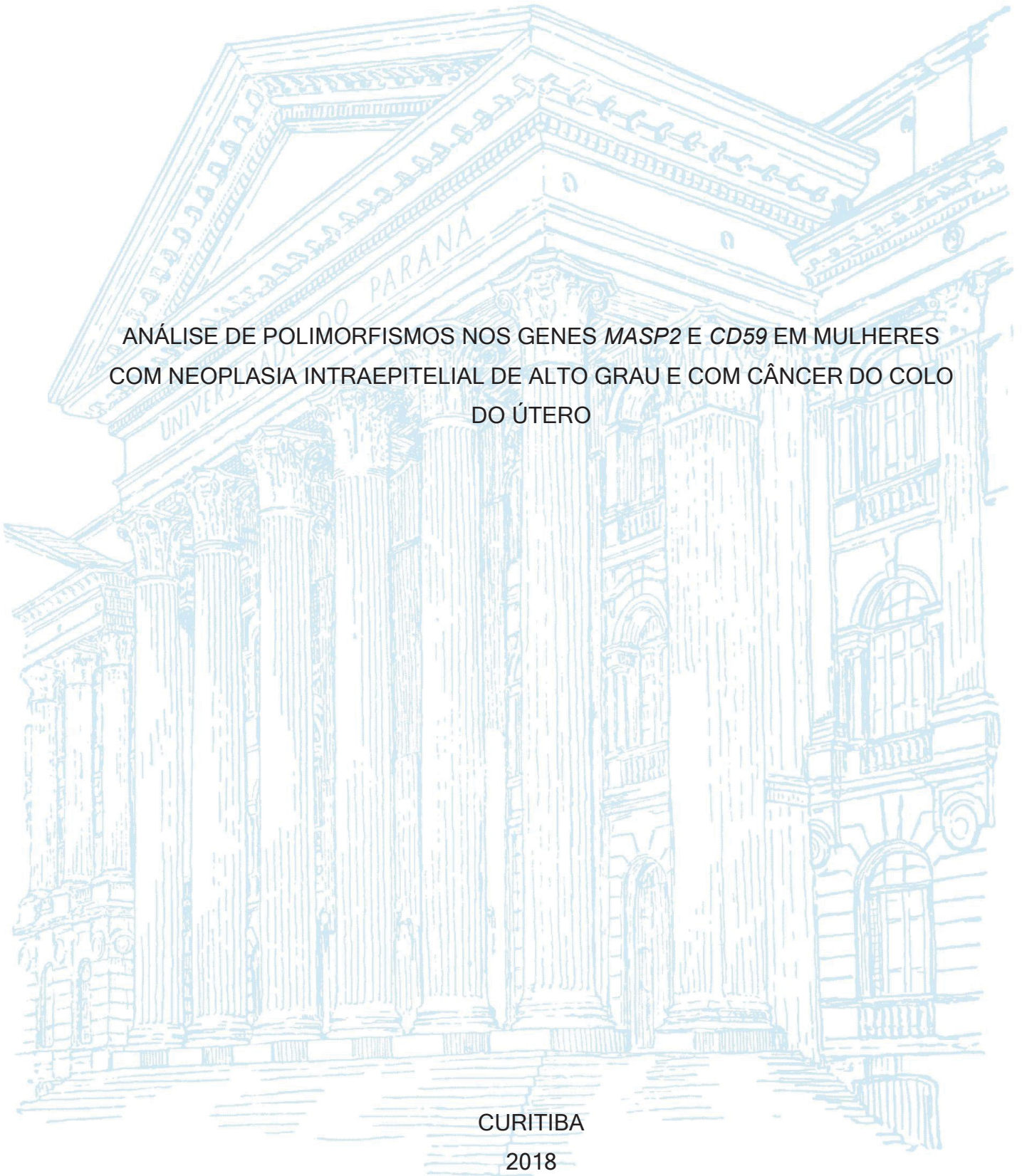
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STEFANIE EPP BOSCHMANN

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES *MASP2* E *CD59* EM MULHERES  
COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL DE ALTO GRAU E COM CÂNCER DO COLO  
DO ÚTERO

CURITIBA

2018



STEFANIE EPP BOSCHMANN

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES *MASP2* E *CD59* EM MULHERES  
COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL DE ALTO GRAU E COM CÂNCER DO COLO  
DO ÚTERO

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Medicina Interna e Ciências da Saúde, ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, do Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Iara J. T. de Messias Reason  
Co-orientadora: Profa. Dra. Angélica B. Winter Boldt

CURITIBA  
2018

B742 Boschmann, Stefanie Epp

Análise de polimorfismos nos genes MASP2 e CD59 em mulheres com neoplasia intraepitelial de alto grau e com câncer do colo do útero [recurso eletrônico] / Stefanie Epp Boschmann. – Curitiba, 2018.

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iara J. T de Messias-Reason

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angelica B. Winter Boldt

1. Neoplasia intraepitelial cervical. 2. Neoplasias do colo do útero. 3. Serina proteases associadas a proteína de ligação a manose. 4. Antígenos CD59. I. Messias-Reason, Iara J. T. de. II. Boldt, Angelica B. Winter. III. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLMC: QZ 200

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



## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **STEFANIE EPP BOSCHMANN** intitulada: "ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES *MASP2* E *CD59* EM MULHERES COM NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL DE ALTO GRAU E COM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 24 de Maio de 2018.

UFPR

IARA JOSE DE MESSIAS REASON  
Presidente da Banca Examinadora

LÚCIA DE NORONHA  
Avaliador Externo

FERNANDA VILLAR FONSECA  
Avaliador Externo

MARCIA HOLSBACK BELTRAME  
Avaliador Externo

ODERY RAMOS JUNIOR  
Avaliador Interno

Dedico essa tese ao meu marido Daniel, que sonhou junto comigo esse sonho, vibrou com minhas conquistas e fez parte dessa trajetória; aos meus filhos amados Nicolas, Olivia e Sarah, que são minha grande fonte de alegria e maior realização; e às minhas queridas orientadoras Profa. Dra. Iara de Messias-Reason e Profa. Dra. Angelica W. Boldt, que me deram todo suporte e apoio necessário para que eu pudesse realizar esse trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, que me guiou e sustentou durante todo o percurso. “Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele seja a glória para sempre!” (Romanos 11:36)

À minha orientadora, Profa. Dra. Iara de Messias-Reason, que, com seu amplo conhecimento e experiência, me orientou, ensinou e contribuiu para a realização desse estudo. O seu apoio e suporte foram fundamentais em todo o processo. Sou muito grata por ter confiado em mim, pela paciência, tempo e esforços despendidos e por ter me dado essa grande oportunidade de fazer o doutorado.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Angelica Winter Boldt, que tanto me incentivou a ingressar no doutorado e me apoiou de forma incondicional durante toda a trajetória. Obrigada pela imensa disponibilidade para ajudar, orientar, ensinar e analisar resultados, sempre com muita paciência, amor e dedicação. Sem você, não teria conseguido chegar até aqui.

Aos membros da banca avaliadora de defesa, Dra. Lucia de Noronha, Profa. Dra. Marcia Holsbach Beltrame, Dra. Fernanda Villar Fonseca e Prof. Dr. Odey Ramos Junior, pela presença na defesa e leitura cuidadosa da tese, pelas críticas construtivas e valiosas sugestões.

Ao Ery Pedro Tavares, por não ter medido tempo e esforços para realizar as coletas de sangue no Hospital Erasto Gaertner. A tua contribuição, com certeza, foi essencial para a realização desse estudo.

À Dra. Grazielle Moraes Losso e à equipe do Laboratório Mantis, pela colaboração com materiais, equipamentos e espaço físico para a realização das extrações de DNA e PCR-SSP.

À Amanda Salviano da Silva, pelo auxílio com as genotipagens das amostras.

À Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho e ao Dr. Carlos Maestri, pela colaboração com amostras, resultados e dados de pacientes.

À Camila Oliveira-Toré, pela ajuda com a análise de resultados.

Ao meu marido Daniel, pelas palavras de encorajamento e por sempre estar aberto para me ouvir e fazer parte das minhas descobertas.

Aos meus filhos Nicolas e Olivia, que, mesmo sentindo minha ausência, me cercaram com tanto amor e carinho.

Aos meus pais Manfred e Rosemarie, por estarem sempre presentes, por todo o apoio, palavras de incentivo e pelas inúmeras orações.

À minha sogra Monica, que tantas vezes cuidou dos meus filhos para que eu pudesse escrever a tese. Obrigada por todo suporte e apoio!

## RESUMO

O câncer do colo do útero é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo. A sua principal causa é a infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) oncogênico no colo do útero. A infecção pelo HPV pode levar ao desenvolvimento de lesões pré-cancerosas, denominadas de neoplasia intraepitelial cervical, que, se não tratadas, podem evoluir para câncer do colo do útero. O sistema complemento (SC) é composto por mais de 50 proteínas, que participam da resposta imune inata. A sua ativação, que pode ocorrer através das vias clássica, alternativa e das lectinas, culmina em importantes efeitos biológicos, como recrutamento de células inflamatórias, opsonização, fagocitose e na formação do complexo de ataque a membrana (MAC), que resulta na lise celular. A serina protease MASP-2, complexada a colectinas/ficolinas, tem um papel importante na ativação da via das lectinas. CD59 é uma proteína reguladora do SC que bloqueia a formação da MAC na membrana celular. Concentrações elevadas de MASP-2 no soro foram associadas à recidiva tumoral e menor sobrevida em pacientes com câncer. Em diversas células tumorais, foi observado um aumento da expressão de CD59, provavelmente como mecanismo de defesa contra a ação lítica do SC. Nesse estudo, investigamos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), por meio de PCR-SSP (Reação em Cadeia da Polimerase com Iniciadores de Sequência Específica), no gene *MASP2*, associados anteriormente a alterações na expressão da proteína MASP-2, e no gene *CD59*, localizados em regiões moduladoras da expressão gênica. Foram incluídas 193 mulheres com NIC de alto grau, 114 com câncer do colo do útero e dois grupos de comparação: um grupo com 190 mulheres, para análise de *MASP2*, e outro com 138 mulheres, para análise de *CD59*. Comparamos os haplótipos de *MASP2* com as concentrações séricas de MASP-2, quantificadas em 84 mulheres com NIC de alto grau e em 134 mulheres do grupo de comparação, por meio da técnica TRIFMA. Não houve associação entre os SNPs e haplótipos de *MASP2* e NIC ou câncer cervical. Não houve associação entre os haplótipos de *MASP2* e a concentração de MASP-2 entre mulheres com NIC de alto grau, o que poderia indicar que a infecção pelo HPV e/ou ambiente tumoral altera a expressão da proteína. Por outro lado, houve associação entre os quatro SNPs de *CD59* e câncer cervical. Os SNPs no intron 3, *rs861256\*G* e *rs831625\*G*, foram associados com susceptibilidade para a doença (OR=2,07, IC=1,43-3, P=0,0001; e OR=2,56, IC=1,75-3,73, P<0,0001, respectivamente) e os SNPs na região não traduzida 3', *rs704697\*G* e *rs1047581\*G*, com proteção contra a doença (OR=0,54, IC=0,35-0,84, P=0,006; e OR=0,42, IC=0,28-0,6, P<0,0001, respectivamente). Observamos que mulheres homozigotas para o haplótipo GGAA de *CD59*, estão aproximadamente de 2 a 3 vezes mais predispostas a desenvolver câncer cervical que portadoras de outros haplótipos (OR=5,2, IC=2,45-11, P=0,0). O haplótipo GGAA foi associado anteriormente com maior expressão de mRNA de *CD59*. Portanto, acreditamos que esse haplótipo poderia aumentar a expressão da proteína CD59 e, dessa forma, aumentar a resistência das células malignas contra a ação do SC.

**Palavras-chave:** Neoplasia intraepitelial cervical. Câncer do colo do útero. Sistema complemento. Via das lectinas. Polimorfismos. *MASP2*. *CD59*.

## ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth most common type of cancer among women worldwide. The main cause is the persistent infection of oncogenic types of Human Papillomavirus (HPV) in the cervix. HPV infection is responsible for causing precancerous lesions, known as cervical intraepithelial neoplasia (CIN), which, without treatment, can evolve to cervical cancer. The complement system (CS) comprises more than 50 proteins, involved in the innate immune response. The CS can be activated by three different pathways (the classical, the alternative and the lectin pathway) and leads to important biological effects, such as the recruitment of inflammatory cells, opsonization, phagocytosis, formation of the membrane attack complex (MAC) and cell lysis. The serine protease MASP-2, complexed with collectins and ficollins, has an important role in the activation of the lectin pathway. The protein CD59 inhibits the formation of MAC on cell membranes and, therefore, is an important regulator of the CS. High expression of MASP-2 in serum was associated with poor prognosis in various types of cancer. High expression of CD59 has been observed in different tumor cell lines, probably as a mechanism to avoid cell lyses mediated by MAC. In this study, we investigated, using the PCR-SSP method, single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the *MASP2* and *CD59* genes, which were previously associated with MASP-2 altered serum levels and with higher *CD59* mRNA expression, respectively. A total of 193 women with high grade CIN, 114 with cervical cancer and women of two comparative groups (one group with 190 women for *MASP2* analysis and one with 134 for *CD59* analysis) were enrolled. The seven SNPs within the *MASP2* gene weren't associated with high grade CIN and cervical cancer. We also compared *MASP2* haplotypes with MASP-2 serum levels in 85 women with high grade CIN, but no association was found. We suggest that MASP-2 levels probably are modulated by the disease in those patients. Otherwise than for *MASP2*, we found an association between the 4 SNPs in *CD59* in and cervical cancer. The SNPs in intron 3, *rs861256*\*G and *rs831625*\*G, were associated with higher risk of cervical cancer (OR=2,07, IC=1,43-3,0, P=0,0001; e OR=2,56, IC=1,75-3,73, P<0,0001, respectively), as the SNPs within the 3' non-translated region, *rs704697*\*G and *rs1047581*\*G, with protection against the disease (OR=0,54, IC=0,35-0,84, P=0,006; e OR=0,42, IC=0,28-0,60, P<0,0001, respectively). We also observed that homozygotes for the most common *CD59* haplotype, GGAA, have a 2 to 3 time higher chance to develop cervical cancer than carriers of other haplotypes (OR=5,2, IC=2,45-11, P=0,0). The GGAA haplotype was previously associated with higher expression of *CD59* mRNA. Therefore, we suggest that GGAA enhances CD59 expression malignant cells resistance against MAC mediated cytotoxicity.

**Key-words:** Cervical intraepithelial neoplasia. Cervical cancer. Complement system. Lectin pathway. Polymorphisms. *MASP2*. *CD59*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – INFECÇÃO DE CÉLULAS DO COLO DO ÚTERO PELO HPV E PROGRESSÃO PARA CÂNCER DO COLO DO ÚTERO.....	26
FIGURA 2 - EVOLUÇÃO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO .....	27
FIGURA 3 - ATIVAÇÃO DA VIA DAS LECTINAS.....	31
FIGURA 4 - GENE <i>MASP2</i> E OS PRODUTOS MASP-2 E MAP19.....	35
FIGURA 5 - HAPLÓTIPOS DE <i>MASP2</i> .....	36
FIGURA 6 - GENE <i>CD59</i> E O PRODUTO CD59.....	47
FIGURA 7 - FLUXOGRAMA DOS GRUPOS AMOSTRAIS DO ESTUDO.....	55
FIGURA 8 - LOCALIZAÇÃO DOS SNPS NO GENE <i>MASP2</i> .....	58
FIGURA 9 - LOCALIZAÇÃO DOS SNPS NO mRNA DE <i>CD59</i> .....	59
FIGURA 10 – IMAGEM DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DO GENE <i>MASP2</i> POR PCR-SSP MULTIPLEX, COM INICIADORES ESPECÍFICOS PARA SNPS NO INTRON 9, EXONS 10 E 12.....	63

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - POLIMORFISMOS NO GENE <i>MASP2</i> ASSOCIADOS À CONCENTRAÇÃO DE MASP-2.....	39
QUADRO 2 - DOENÇAS ASSOCIADAS À POLIMORFISMOS NO GENE <i>MASP2</i> E/OU À CONCENTRAÇÕES DE MASP-2 .....	41
QUADRO 3 - SNPS DE <i>MASP2</i> ANALISADOS NO ESTUDO.....	58
QUADRO 4- INICIADORES PARA ANÁLISE DOS SNPS NO GENE <i>MASP2</i> .....	60
QUADRO 5 - INICIADORES PARA ANÁLISE DOS SNPS NO GENE <i>CD59</i> .....	61
QUADRO 6 - PROTOCOLO PARA A REAÇÃO DE PCR-SSP MULTIPLEX COM INICIADORES PARA OS SNPS NOS INTRONS 4 E 5 DO GENE <i>MASP2</i> .....	61
QUADRO 7- PROTOCOLO PARA A REAÇÃO DE PCR-SSP MULTIPLEX COM INICIADORES PARA OS SNPS NO INTRON 9 E NOS EXONS 10 E 12 DO GENE <i>MASP2</i> .....	62
QUADRO 8 - PROTOCOLO PARA A REAÇÃO DE PCR-SSP MULTIPLEX COM INICIADORES PARA OS SNPS NO INTRON 3 DO GENE <i>CD59</i> .....	62
QUADRO 9 - PROTOCOLO PARA A REAÇÃO DE PCR-SSP MULTIPLEX COM INICIADORES PARA OS SNPS DE 3'UTR DO GENE <i>CD59</i> .....	63

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS COM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO E COM NIC DE ALTO GRAU. ....	68
TABELA 2 - NÚMERO DE GESTAÇÕES DAS PACIENTES COM CÂNCER CERVICAL E COM NIC DE ALTO GRAU .....	72
TABELA 3 - FREQUÊNCIAS DOS SNPS NO GENE <i>MASP2</i> .....	73
TABELA 4 - FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS DE <i>MASP2</i> , INCLUINDO TODOS OS SNPS AVALIADOS .....	74
TABELA 5 - FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS DE <i>MASP2</i> , INCLUINDO OS SNPS NO INTRON 9 E NOS EXONS 9 E 12.....	74
TABELA 6 - RESULTADOS DO TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG DAS FREQUÊNCIAS DOS SNPS DE <i>MASP2</i> ENTRE AS PACIENTES COM CÂNCER CERVICAL .....	75
TABELA 7 - RESULTADOS DO TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG DAS FREQUÊNCIAS DOS SPS DE <i>MASP2</i> ENTRE AS PACIENTES COM NIC DE ALTO GRAU.....	75
TABELA 8 - RESULTADOS DO TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG DAS FREQUÊNCIAS DOS SNPS DE <i>MASP2</i> ENTRE AS MULHERES DO GRUPO DE COMPARAÇÃO .....	76
TABELA 9 - FREQUÊNCIAS DOS SNPS NO GENE <i>CD59</i> .....	77
TABELA 10 - FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS DE <i>CD59</i> , FORMADOS PELOS SNPS <i>rs861256 A&gt;G</i> , <i>rs831625 C&gt;G</i> , <i>rs1047581 A&gt;G</i> e <i>rs704697 A&gt;G</i> . ....	78
TABELA 11 - ASSOCIAÇÃO ENTRE OS SNPS DE <i>CD59</i> E AS DOENÇAS NIC DE ALTO GRAU E CÂNCER DO COLO DO ÚTERO.....	79
TABELA 12 - ASSOCIAÇÃO ENTRE O HAPLÓTIPO <i>GGAA</i> DE <i>CD59</i> E AS DOENÇAS NIC DE ALTO GRAU E CÂNCER DO COLO DO ÚTERO .....	79
TABELA 13 - ASSOCIAÇÃO ENTRE OS SNPS E O HAPLÓTIPO <i>GGAA</i> DE <i>CD59</i> E CÂNCER DO COLO DO ÚTERO .....	80
TABELA 14 - TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG DAS FREQUÊNCIAS DOS SNPS NO GENE <i>CD59</i> NO GRUPO DE PACIENTES COM CÂNCER CERVICAL .....	81

TABELA 15 - TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG DAS FREQUÊNCIAS DOS SNPS DE <i>CD59</i> NO GRUPO DE PACIENTES COM NIC DE ALTO GRAU. ....	81
TABELA 16 - TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG DAS FREQUÊNCIAS DOS SNPS DE <i>CD59</i> NO GRUPO DE COMPARAÇÃO.....	81
TABELA 17 - RESULTADOS DO TESTE DE DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL COM AS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DO GENE <i>CD59</i> .....	82

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES COM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO E COM NIC DE ALTO GRAU POR FAIXA ETÁRIA .....	69
GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES COM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO E COM NIC DE ALTO GRAU POR COR DA PELE.....	69
GRÁFICO 3 - NÍVEL DE ESCOLARIDADE DAS PACIENTES COM CÂNCER E COM NIC DE ALTO GRAU .....	70
GRÁFICO 4 - HÁBITO DE FUMAR ENTRE AS PACIENTES COM CÂNCER CERVICAL E COM NIC DE ALTO GRAU .....	70
GRÁFICO 5 - IDADE NA PRIMEIRA RELAÇÃO ENTRE AS PACIENTES COM CÂNCER CERVICAL E COM NIC DE ALTO GRAU .....	71
GRÁFICO 6 - HISTÓRICO FAMILIAR DE CÂNCER ENTRE AS PACIENTES COM CÂNCER CERVICAL .....	71
GRÁFICO 7 - REALIZAÇÃO DO EXAME PREVENTIVO PAPANICOLAU PELAS PACIENTES ANTES DO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA.....	72

## **LISTA DE SIGLAS**

HPV - Papilomavírus Humano

NIC - Neoplasia Intraepitelial Cervical

SC - Sistema Complemento

MAC - Complexo de Ataque à Membrana

SNP - Polimorfismo de Nucleotídeo Único

PCR-SSP – Reação em Cadeia da Polimerase com iniciadores de sequência específica

OMS - Organização Mundial de Saúde

INCA - Instituto Nacional de Câncer

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1	OBJETIVOS .....	22
1.1.1	Objetivo Geral.....	22
1.1.2	Objetivos Específicos. ....	22
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>24</b>
2.1	CÂNCER DO COLO DO ÚTERO.....	24
2.2	PREVENÇÃO, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE CÂNCER DO COLO DO ÚTERO.....	27
2.3	O PAPEL DE MASP-2 E CD59 NA ATIVAÇÃO E REGULAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO .....	29
2.4	ESTRUTURA E FUNÇÃO DE MASP-2.....	31
2.5	GENE E EXPRESSÃO DE <i>MASP2</i> .....	32
2.6	VARIAÇÕES GENÉTICAS NO GENE <i>MASP2</i> .....	34
2.7	DOENÇAS ASSOCIADAS A POLIMORFISMOS NO GENE <i>MASP2</i> OU À CONCENTRAÇÃO DE MASP-2.....	36
2.8	CÂNCER ASSOCIADO À CONCENTRAÇÃO DE MASP-2.....	37
2.9	PROTEÍNA CD59.....	44
2.10	GENE E EXPRESSÃO DE <i>CD59</i> .....	47
2.11	VARIAÇÕES GENÉTICAS NO GENE <i>CD59</i> .....	48
2.12	DOENÇAS ASSOCIADAS À EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CD59.....	49
2.13	EXPRESSÃO DE CD59 EM CÉLULAS TUMORAIS .....	51
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
3.1	CASUÍSTICA.....	53
3.2	MÉTODOS .....	56
3.2.1	Coleta de Material .....	56
3.2.2	Extração de DNA.....	56
3.2.3	PCR-SSP .....	57
3.2.4	Quantificação sorológica de MASP-2 .....	64
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>67</b>

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE MULHERES COM NIC DE ALTO GRAU E COM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO.....	67
4.2 RESULTADOS DA ANÁLISE DOS SNPS NO GENE <i>MASP2</i> .....	73
4.3 RESULTADOS DA ANÁLISE DOS SNPS NO GENE <i>CD59</i> .....	77
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>
5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS GRUPOS AMOSTRAIS DO ESTUDO .....	83
5.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS SNPS DE <i>MASP2</i> E CÂNCER DO COLO DO ÚTERO .....	85
5.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS SNPS DE <i>CD59</i> E CÂNCER DO COLO DO ÚTERO .....	87
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>90</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>
<b>APÊNDICE A – TCLE.....</b>	<b>100</b>
<b>APÊNDICE B – INSTRUMENTO PARA QUESTIONÁRIO.....</b>	<b>104</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é um tipo de câncer que se origina no epitélio escamoso da ectocérvice ou no epitélio colunar do canal endocervical. A sua principal causa é a infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) no colo do útero devido à uma resposta imune ineficiente contra o vírus (VAN DE WALL; NIJMAN; DAEMEN, 2014).

Entre os mais de 150 tipos de HPV conhecidos, aproximadamente 40 podem infectar o trato ano-genital, e, pelo menos, 13 tipos são oncogênicos. A transmissão do HPV ocorre principalmente por meio do contato sexual. Acredita-se que a maioria das mulheres e homens sexualmente ativos é infectada por ele em algum momento da vida (WHO, 2016).

Entre as infecções por HPV, cerca de 90% dos casos regride espontaneamente em até dois anos, sem alguma intervenção. Uma pequena proporção de infecções com determinados tipos de HPV (principalmente com os tipos 16 e 18) podem persistir e causar lesões pré-cancerosas, que caracterizam a neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Quando as lesões não são detectadas e tratadas precocemente, podem evoluir para câncer (WHO, 2016). Inicialmente, as lesões são de baixo grau (NIC 1), mas podem progredir para lesões de alto grau (NIC 2 e 3) e, posteriormente, para câncer.

O câncer do colo uterino é o quarto tipo de câncer mais frequente entre as mulheres no mundo. Em 2018, 570.000 novos casos foram estimados, representando 6,6% de todos os casos de câncer feminino. Esse tipo de câncer é responsável por mais de 270.000 óbitos por ano, sendo que aproximadamente 90% dos óbitos ocorrem em regiões subdesenvolvidas, provavelmente devido à falta de rastreamento e detecção precoce da doença (WHO, 2019). No Brasil, foram registrados 17.540 novos casos em 2015 e, para o ano 2018, foram estimados 16.370 novos casos (INCA, 2018a, 2019). Em 2015, foram registrados 5.727 óbitos por esse tipo de câncer (INCA, 2019). Em termos de incidência e mortalidade, o câncer cervical ocupa a terceira posição no Brasil, excluindo o câncer de pele não melanoma (INCA, 2018a).

Os mecanismos envolvidos na progressão de lesões causadas pelo HPV para câncer do colo do útero ainda não estão bem esclarecidos. Sabe-se que fatores

ligados à imunidade, à genética e ao comportamento sexual têm um papel importante nesse processo (INCA, 2018a).

Sasagawa et al. (2012) sugeriram que células infectadas pelo HPV falham em apresentar o antígeno viral e em induzir a resposta inflamatória. As proteínas E6 e E7, codificadas por genes do HPV16, diminuem a expressão de interferons do tipo 1 por células autólogas. Durante o reconhecimento de antígenos, a falta de sinalização pelas citocinas poderia levar a tolerância imunológica. Já a proteína E5, também codificada pelo HPV16, parece diminuir a expressão da molécula HLA de classe 1, o que facilitaria a evasão do vírus ao ataque de linfócitos T citotóxicos. Estes mecanismos de escape poderiam, eventualmente, conduzir a persistência da infecção pelo HPV (SASAGAWA; TAKAGI; MAKINODA, 2012).

Enquanto que, por um lado, o vírus apresenta mecanismos para escapar da ação do sistema imune, por outro lado, indivíduos podem apresentar uma resposta imune alterada e ineficaz para eliminar adequadamente patógenos ou células próprias alteradas, como as células malignas.

O sistema complemento (SC), um dos principais mediadores da imunidade inata e ponte entre a imunidade inata e a adaptativa, exerce um papel importante na primeira linha de defesa do organismo contra a entrada de patógenos. A ativação do SC resulta em importantes efeitos biológicos, como no recrutamento de células inflamatórias, fagocitose, formação do complexo de ataque à membrana (MAC) e lise celular (RICKLIN et al., 2010). Alterações nas concentrações de proteínas do SC e polimorfismos genéticos, associados a essas condições, podem conferir maior risco para o desenvolvimento de certas doenças, incluindo doenças virais e vários tipos de câncer (BELTRAME et al., 2015; HU et al., 2013; LEE et al., 2015; WANG et al., 2016). Em pacientes infectados pelo HPV, por exemplo, foi observado um aumento da expressão da proteína C3 do SC (CANALES et al., 2014).

O SC pode ser ativado através de três vias: clássica, alternativa e das lectinas. A proteína MASP-2, complexada à padrões de reconhecimento molecular (PRM), como as colectinas e ficolinas, desempenha um papel importante na ativação da via das lectinas. Os diferentes PRMs reconhecem e se ligam a carboidratos ou resíduos acetilados na superfície de microorganismos ou em células próprias alteradas. Uma vez ativada, MASP-2 cliva os fatores C2 e C4 do SC, que resultam na formação da C3 convertase, responsável por clivar a proteína C3 (revisto por BOLDT et al., 2016a).

Expressão aumentada de MASP-2, associada à variante *p.371D* no gene *MASP2*, foi associada ao aumento da susceptibilidade à infecções causadas pelo vírus da hepatite C, o HCV (TULIO et al., 2011a), e pelo vírus humano linfotrópico T, o HTLV-1 (COELHO et al., 2013). Concentrações elevadas de MASP-2 também foram observadas em pacientes com câncer colorretal, câncer do ovário, carcinoma papilar da tireoide, tumor no sistema nervoso central e outros tipos de câncer, e foram associados com pior prognóstico e menor sobrevida de pacientes com câncer (SHI et al., 2013; FISCH et al., 2011; YTTING et al., 2005, 2008b). Em relação ao câncer cervical, ainda não existem estudos de associação com a proteína MASP-2 ou o gene *MASP2*.

Se, por um lado, concentrações elevadas de MASP-2 podem influenciar na patogênese de certas doenças, por outro lado, baixas concentrações podem comprometer a resposta imune contra patógenos e favorecer infecções causadas por eles. Dessa forma, o SC pode apresentar um papel duplo no desenvolvimento de doenças (BELTRAME et al., 2015). O mesmo foi observado em câncer. O SC pode auxiliar na destruição de células malignas, mas também pode promover o desenvolvimento tumoral devido à resposta inflamatória (MAMIDI; HÖNE; KIRSCHFINK, 2017).

Portanto, considerando que MASP-2 é um marcador desfavorável para vários tipos de câncer e que diversas variações genéticas, que podem modular a expressão da proteína, foram associadas a doenças causadas por vírus, percebemos a necessidade de investigar polimorfismos no gene *MASP2* em câncer cervical. Acreditamos que tanto a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de lesões no colo do útero, bem como o próprio processo de carcinogênese, poderiam ser influenciados por alterações nas concentrações de MASP-2 e por alelos que modulam a expressão do gene.

O SC não é formado apenas por proteínas envolvidas na sua ativação, mas também por proteínas regulatórias, que impedem a ação lítica indesejada do SC contra células autólogas, direcionam a sua ação contra o alvo adequado e também podem finalizar a sua ativação, quando necessário (SCHMIDT; LAMBRIS; RICKLIN, 2016).

A proteína CD59 é um importante regulador do SC, que inibe a formação do MAC na superfície celular e, conseqüentemente, a lise da célula mediada por ele. Ancorada à membrana por meio de uma âncora de glicofosfatidilinositol (GPI), ela se

liga a um complexo formado pelos fatores C5b, C6, C7 e C8 na superfície de células e inibe a ligação do fator C9 ao mesmo, o que seria necessário para a formação do MAC (NINOMIYA; SIMS, 1992).

A proteína CD59 é principalmente expressa por células autólogas para protegê-las contra a ação do SC. Entretanto, alguns tipos virais e células malignas também integram essa proteína à sua superfície, provavelmente, como mecanismo de escape à ação lítica do SC. Isso foi observado em alguns vírus envelopados, como, por exemplo, no vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1), no vírus da herpes 1 (HSV-1) e no HCV (AMET et al., 2012a; HU et al., 2010; NGUYEN; HILDRETH, 2000; SAIFUDDIN et al., 1995; SPEAR et al., 1995; VANDERPLASSCHEN et al., 1998). Células tumorais de diferentes tipos, incluindo de carcinoma seroso do útero (BELLONE et al., 2012) e câncer de mama (OUYANG et al., 2016a), apresentaram expressão aumentada de CD59, o que parece ser um marcador desfavorável para sobrevida dos pacientes. Entre pacientes com câncer do colo do útero e com expressão elevada de CD59, apenas 42% tiveram sobrevida de 5 anos, enquanto que entre as pacientes com baixa expressão de CD59, 71% tiveram sobrevida de 5 anos (UHLÉN et al., 2005).

De acordo com estudos anteriores, é possível que a expressão de CD59 por células malignas seja regulada pelo próprio microambiente tumoral. Entretanto, o aumento da concentração dessa proteína poderia estar associado também a fatores genéticos. Salviano-Silva et al. (2016) analisaram polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no intron 3 e na região não traduzida 3' do gene *CD59* em pacientes com pênfigo foliáceo. O haplótipo formado pelos alelos *rs831625\*G* (intron 3), *rs704701\*C* e *rs704697\*A* (3'UTR), estava associado com maior expressão de mRNA e com susceptibilidade à doença. De acordo com a localização desses SNPs, é possível que aqueles situados no intron 3 influenciem no processamento alternativo de *CD59*, aumentando a expressão da principal isoforma de CD59. Já os SNPs localizados na região 3'UTR, poderiam influenciar na regulação da expressão gênica (SALVIANO-SILVA; PETZL-ERLER; BOLDT, 2017).

Até o momento, não existem estudos envolvendo polimorfismos no gene *CD59* e câncer. Acreditamos que a expressão aumentada da proteína na superfície de células malignas poderia ser influenciada por SNPs situados em regiões reguladoras de *CD59*, como na região 3'UTR, ou em regiões que influenciam o processamento pós-transcricional do gene, como no intron 3. Consideramos que os

SNPs analisados por Salviano-Silva (2016) poderiam alterar também a expressão gênica de *CD59* em pacientes com câncer, mais especificamente em câncer do colo do útero, e, portanto, poderiam ser importantes marcadores moleculares para susceptibilidade à doença.

O câncer do colo do útero é uma doença que tem um alto potencial de cura, quando detectado precocemente. Portanto, marcadores moleculares poderiam auxiliar na identificação de mulheres com maior risco para o desenvolvimento dessa doença. Acreditamos que *CD59* é um importante gene candidato para investigar novos marcadores e que estudos de associação entre polimorfismos nesse gene e câncer cervical, poderiam ajudar a esclarecer fatores envolvidos no desenvolvimento da doença. Considerando que concentração elevada de *CD59* em células malignas aumenta a resistência dessas contra o ataque do SC, é possível que indivíduos, que apresentam polimorfismos no gene *CD59* associados à maior expressão da proteína, sejam mais susceptíveis para câncer do colo do útero.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

O principal objetivo do estudo foi investigar se polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e haplótipos nos genes *MASP2* e *CD59* alteram a propensão à neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de alto grau e ao câncer do colo do útero em mulheres.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do estudo foram:

- Determinar as frequências alélicas e haplotípicas de SNPs nos genes *MASP2* e *CD59* em mulheres com NIC de alto grau e com câncer do colo do útero;
- Investigar possíveis associações entre SNPs e haplótipos nos genes *MASP2* e *CD59* e NIC de alto grau;
- Investigar possíveis associações entre SNPs e haplótipos nos genes *MASP2* e *CD59* e câncer do colo do útero;

- Investigar possível associação entre SNPs no gene *MASP2* e concentrações séricas da proteína MASP-2 em pacientes com NIC de alto grau.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

O câncer do colo do útero, também chamado de câncer cervical, é o terceiro tipo de câncer mais frequente na população feminina no Brasil, atrás somente do câncer de mama e do câncer colorretal. É ainda a quarta causa de morte de mulheres por câncer no país (INCA, 2018b). Entre as mulheres no mundo, é o quarto tipo de câncer mais frequente, com incidência anual de aproximadamente 500.000 casos novos (WHO, 2016). A cada ano, estima-se que ocorrem mais de 270.000 óbitos por esse tipo de câncer, o que representa 7,5% dos óbitos por câncer entre mulheres. Interessantemente, mais de 85% dos óbitos ocorrem em regiões subdesenvolvidas, o que poderia estar relacionado com o diagnóstico tardio da doença (WHO, 2016). O tratamento precoce pode prevenir até 80% dos casos de câncer cervical. Portanto, países onde existem programas que permitem a identificação ampla de mulheres com lesões pré-cancerosas em estágios iniciais, possuem menos casos de câncer (WHO, 2016).

O câncer cervical se origina no epitélio escamoso da ectocérvice (carcinoma) ou no epitélio colunar, também chamado de glandular, da endocérvice (adenocarcinoma). Os tipos histopatológicos mais frequentes são o carcinoma epidermóide, que representa 90% dos casos, e o adenocarcinoma, que representa 10%. Além desses, podem ocorrer outros tipos histopatológicos de menor frequência, como carcinoma de pequenas células, carcinoma adenoescamoso, sarcomas e linfomas (INCA, 2018c).

A principal causa do câncer do colo do útero é a infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) (FIGURA 1). Aproximadamente 99,7% dos casos são causados por esse vírus. O HPV é transmitido sexualmente, sendo que o momento auge para adquirir infecções para homens e mulheres é pouco depois de se tornarem sexualmente ativos. A transmissão pode ocorrer apenas pelo contato de pele entre os órgãos genitais e, portanto, a penetração não é necessária para tal. Além do colo do útero, o HPV pode causar também câncer do ânus, da vulva, da vagina e do pênis, bem como da garganta (transmitido por sexo oral), com uma frequência menor (WHO, 2016).

A maioria das mulheres ou homens sexualmente ativos é infectada pelo HPV em algum momento da vida, alguns até repetidamente. No mundo, cerca de 291 milhões de mulheres são portadoras do HPV, sendo que 32% estão infectadas pelos tipos oncogênicos 16 e 18, ou por ambos (INCA, 2018a). Foi estimado que entre as pessoas infectadas pelo HPV, apenas 5% desenvolvem algum tipo de manifestação clínica. Comparando o número de casos de infecções por HPV e de câncer do colo do útero, é possível verificar que a infecção pelo HPV é um fator necessário, mas não suficiente para causar o câncer (INCA, 2018a). Acredita-se que fatores relacionados à resposta imune tenham um papel importante na persistência da infecção pelo HPV e, conseqüentemente, no desenvolvimento do câncer cervical.

Sabe-se que existem mais de 100 tipos de HPV, entre os quais pelo menos 13 são oncogênicos. Geralmente as infecções causadas por esse vírus regridem em poucos meses após serem adquiridas, até 90% dos casos desaparecem em até 2 anos, sem causar sintomas. Tipos não-oncogênicos, como o HPV 6 e 11, podem levar ao desenvolvimento de verrugas genitais altamente infecciosas e a papilomatose respiratória, mas muito raramente resultam em morte. Uma pequena proporção de infecções causada por certos tipos de HPV, especialmente pelos tipos 16 e 18, pode persistir e levar ao desenvolvimento de lesões pré-cancerosas, que, se não tratadas, podem progredir para câncer cervical (WHO, 2016).

A progressão da infecção pelo HPV oncogênico para câncer cervical invasivo pode levar entre 15 a 20 anos em mulheres com um sistema imune normal ou de 5 a 10 anos em mulheres com o sistema imune suprimido. Uma vez que as células escamosas ou glandulares do colo do útero são infectadas pelo HPV, ocorre a replicação do vírus. Caso a resposta imune da pessoa infectada seja ineficiente para eliminar o vírus, a infecção pode persistir e levar ao surgimento de lesões pré-cancerosas. Essas lesões se caracterizam pela displasia celular, que inicialmente é leve, porém evolui para moderada e depois para grave. De acordo com as alterações histológicas que ocorrem no local das lesões, essas podem ser classificadas em neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de grau 1, grau 2 e, por fim, grau 3 (FIGURA 2).

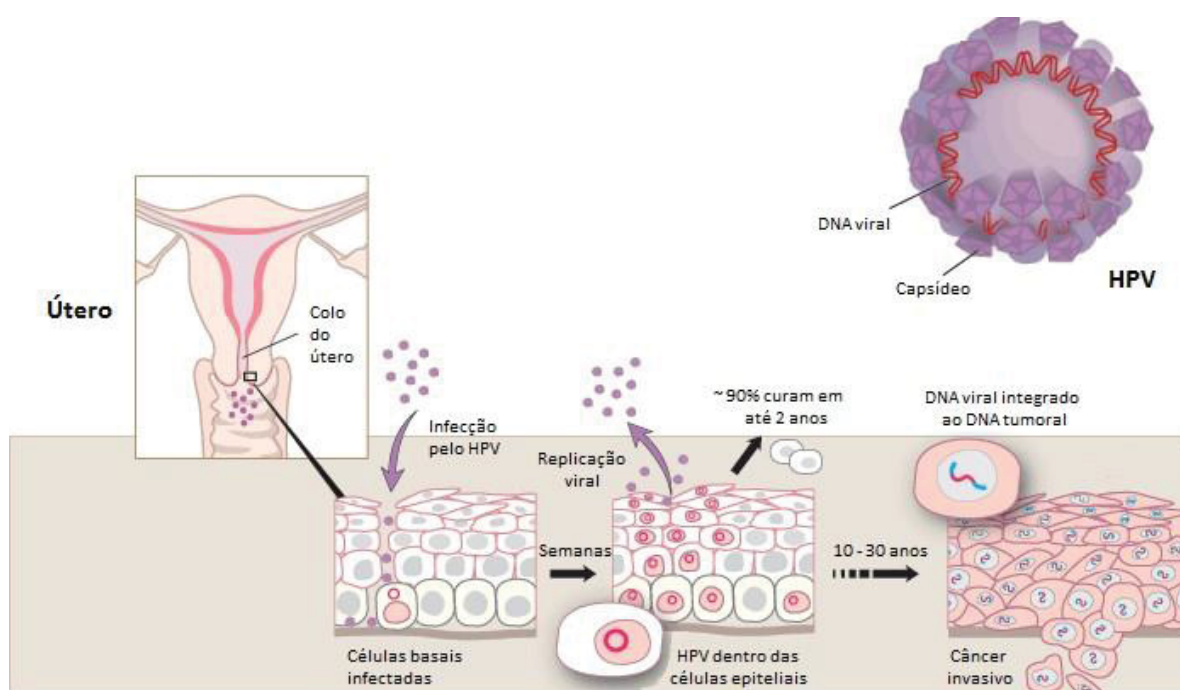
Quando as lesões pré-cancerosas são detectadas, podem ser tratadas e pode-se evitar assim o desenvolvimento de câncer. Porém, quando não tratadas, as lesões podem evoluir para carcinoma in situ e, uma vez que as células malignas ultrapassam a membrana basal, o carcinoma passa a ser invasivo (FIGURA 1 e 2).

Caso a invasão do estroma cervical subjacente não tenha mais de 5 mm de profundidade e 7 mm de largura, o carcinoma é denominado de microinvasivo.

Os sintomas do câncer podem aparecer apenas em estágios mais avançados e incluem: sangramento vaginal irregular, intermenstrual e anormal após relações sexuais, dores nas costas, pernas e pelve, fadiga, perda de peso, perda de apetite, desconforto e odor vaginal, e edema em uma das pernas. Sintomas mais graves podem surgir em estágios avançados (WHO, 2016).

Alguns fatores podem aumentar o risco para a persistência da infecção pelo HPV e para o desenvolvimento do câncer do colo uterino, tais como início da atividade sexual precoce, número elevado de parceiros sexuais, multiparidade, uso de tabaco e sistema imune suprimido (INCA, 2018a).

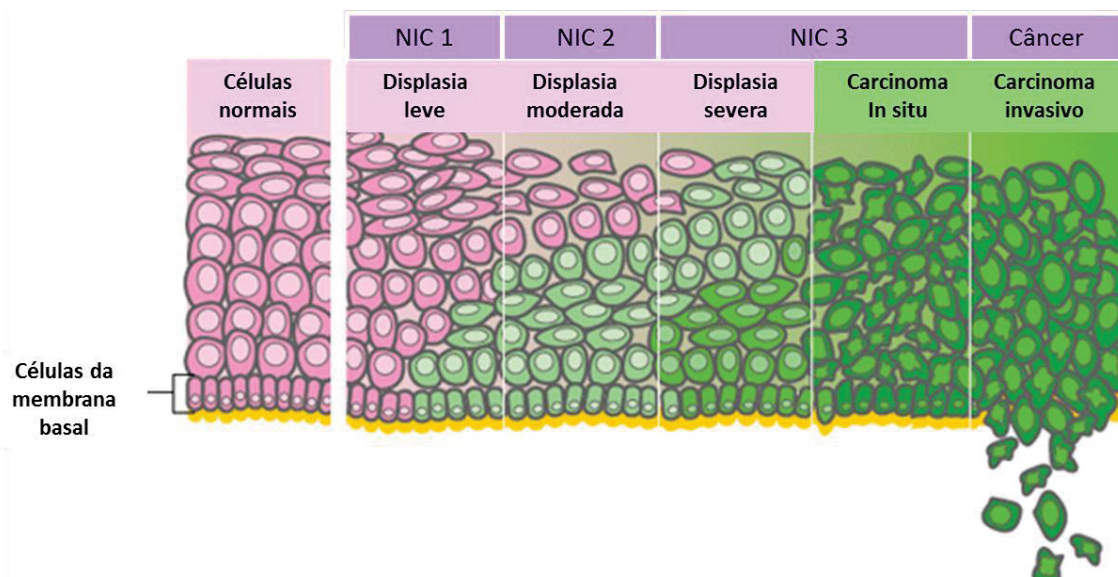
FIGURA 1. INFEÇÃO DE CÉLULAS DO COLO DO ÚTERO PELO HPV E PROGRESSÃO PARA CÂNCER DO COLO DO ÚTERO.



FONTE: Adaptado de “The Nobel Committee for Physiology or Medicine”, 2008.

NOTA: Após a infecção de células basais do colo do útero pelo HPV, ocorre a replicação viral. Em aproximadamente 90% das mulheres infectadas, a infecção regride em até 2 anos. Porém, a infecção pode progredir para câncer do colo do útero. Quando as células malignas ultrapassam a membrana basal, o câncer se torna invasivo.

FIGURA 2. EVOLUÇÃO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO.



FONTE: GIUS et al., 2007

NOTA: Após a infecção de células escamosas do colo do útero pelo vírus HPV oncogênico, ocorre o processo de diferenciação celular e de alterações histológicas, de forma progressiva. As lesões pré-cancerosas são classificadas em neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de grau 1, 2 e 3, e podem evoluir para carcinoma invasivo, quando as células malignas ultrapassam a membrana basal.

## 2.2 PREVENÇÃO, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

Considerando que a transmissão do HPV ocorre por via sexual, a prevenção primária visa diminuir o risco de contágio. O uso de preservativos durante a relação sexual protege parcialmente, pois o contágio pode ocorrer também através do contato de pele com a vulva, região perianal e bolsa escrotal. Outras formas de prevenção primária incluem evitar fatores de risco, como início precoce da atividade sexual e múltiplos parceiros. Outros fatores de risco, como tabagismo e uso prolongado de pílulas anticoncepcionais, também devem ser evitados (WHO, 2016).

O rastreamento de mulheres por meio de exames do colo uterino é uma forma eficaz para detectar lesões pré-cancerosas e câncer em estágio inicial, quando o tratamento tem um elevado potencial de cura. Entre os testes de rastreamento, podemos destacar o exame convencional Papanicolaou, baseado em citologia líquida e inspeção visual. Esse teste deve ser realizado de forma cuidadosa para

garantir que células escamosas e glandulares da zona de transformação do colo do útero sejam coletadas. Recomenda-se que o rastreamento seja realizado pelo menos uma vez em todas as mulheres com idade entre 30 e 49 anos e, de preferência, anualmente (WHO, 2016).

A tipagem do vírus HPV em pacientes com neoplasia intraepitelial é uma prática já realizada comumente em vários países, como nos EUA. No Brasil ainda não é realizado rotineiramente. A identificação do tipo de HPV pode antecipar se a lesão poderá ou não evoluir para câncer e, portanto, pode ser de grande importância para adotar medidas preventivas mais rigorosas para mulheres portadoras de HPV oncogênico.

A vacinação contra o vírus HPV é outra forma de prevenção. O Ministério da Saúde implementou no Brasil, em 2014, o programa de vacinação contra o HPV para meninas de 9 a 13 anos. Em 2017, a idade das meninas se estendeu para 14 anos e foram incluídos meninos de 11 a 14 anos. A vacina é tetravalente e inclui os subtipos 6, 11, 16 e 18 do HPV. Os tipos 6 e 11 não são oncogênicos, porém causam verrugas genitais. Já os últimos dois são responsáveis por causar cerca de 70% dos casos de câncer do colo do útero. Estas vacinas tem um efeito melhor se administradas antes de ocorrer exposição ao HPV, de preferência antes do primeiro contato sexual. Por isso, a Organização Mundial de Saúde recomenda, como medida de saúde pública de melhor custo-benefício, a vacinação de meninas com idade entre 9 e 13 anos (INCA, 2018c).

A vacinação contra HPV não trata infecções pelo HPV ou doenças associadas e não pode substituir programas de rastreamento para câncer cervical (WHO, 2016). Portanto, mesmo as mulheres vacinadas contra o HPV, deverão fazer o exame preventivo periodicamente a partir dos 25 anos, idade preconizada no Brasil (INCA, 2018c).

O tratamento de câncer do colo do útero a ser adotado depende do estadiamento da doença. Inicialmente, quando apenas uma lesão de baixo grau é observada, é indicado um novo exame citológico após 1 ano para mulheres de 25 a 30 anos e a repetição do exame após 6 meses para mulheres com ou mais de 30 anos. Caso a lesão evolua para uma lesão de alto grau, é importante a realização da colposcopia. Caso o tumor já esteja em estágio invasivo, o tratamento pode incluir radioterapia, braquiterapia e quimioterapia, ou até mesmo ressecção tumoral e histerectomia. Novos tratamentos, ainda em fase de estudo, incluem o

imunoterápico ADX11-001, Nivolumab, Pembrolizumabe e Bevacizumab ((INCA, 2018c).

### 2.3 O PAPEL DE MASP-2 E CD59 NA ATIVAÇÃO E REGULAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento (SC) é um sistema complexo formado por mais de 50 proteínas plasmáticas e associadas à membrana (KJAER; THIEL; ANDERSEN, 2013), que tem um papel importante como mediador da imunidade inata, participando da primeira linha de defesa do organismo contra infecções causadas por patógenos, como bactérias, vírus ou protozoários. Além disso, o SC atua também como ponte entre a imunidade inata e a adaptativa, na ativação de células endoteliais e epiteliais e na ativação de plaquetas (DUNKELBERGER; SONG, 2010; RICKLIN et al., 2010).

A ativação do SC pode ser iniciada por três vias: a clássica, a alternativa e a via das lectinas. As três vias convergem em uma cascata proteolítica, que culmina com o recrutamento de células inflamatórias, fagocitose e lise celular mediada pelo complexo de ataque à membrana (MAC) (RICKLIN et al., 2010). A ativação do SC produz as anafilatoxinas C3a, C4a e C5a, que são potentes mediadores proinflamatórios, e as opsoninas C3b e C4b, que cobrem a superfície de patógenos e, dessa forma, mediam a fagocitose. O SC elimina complexos imunes, debris celulares e conduz a respostas imunes inflamatórias e citolíticas altamente eficientes e reguladas (DUNKELBERGER; SONG, 2010).

A ativação da via clássica é iniciada, principalmente, por complexos imunes, formados por anticorpos das classes IgM ou IgG ligados a um antígeno, e pela ligação de C1q à região Fc dos anticorpos, dando início a uma reação em cascata. A ativação da via alternativa ocorre pela hidrólise espontânea de C3 no plasma. Já a ativação da via das lectinas é iniciada pela ligação de moléculas de reconhecimento padrão (PRMs) a carboidratos ou resíduos acetilados, presentes na superfície de microrganismos (conhecidos como PAMPs), ou a padrões glicolizados aberrantes em células apoptóticas, necróticas ou malignas (também conhecidos como DAMPs) (RICKLIN et al., 2010).

As PRMs da via das lectinas, que incluem a MBL, as ficolinas 1, 2 e 3, e as colectinas 10 e 11, formam complexos com proteínas serina proteases (MASP-1, 2 e

3) ou com proteínas truncadas (MAp19 e MAp44). Os complexos, em sua maioria, são constituídos por um dímero de MASP e um PRM (DEGN et al., 2013; ROSBJERG et al., 2014).

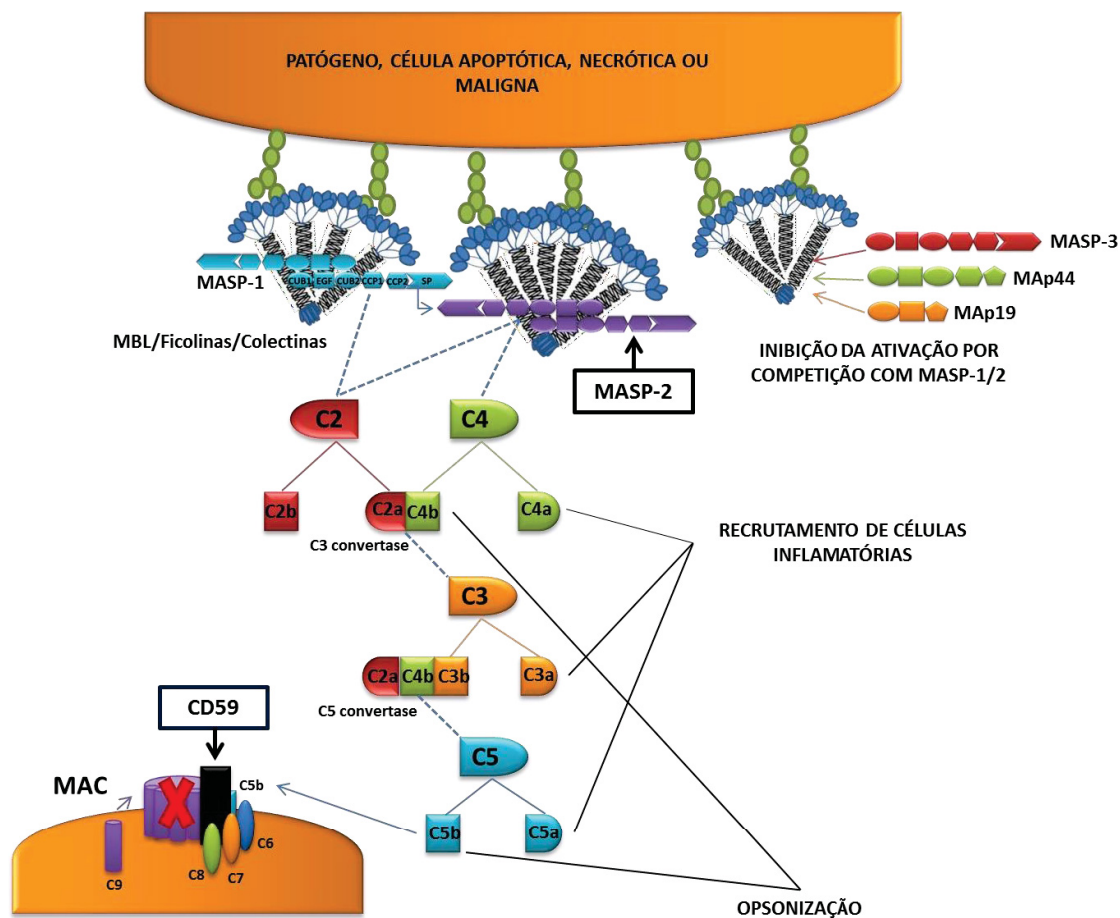
Quando os PRMs se ligam aos PAMPs ou DAMPs, MASP-1 e MASP-2 são convertidas de pró-enzimas para sua forma ativa e, dessa forma, ativam a cascata da via das lectinas (FIGURA 3). A MASP-3, ao contrário de MASP-1 e 2, inibe a ativação da via das lectinas ao competir pelos mesmos sítios de ligação nas PRMs (DEGN et al., 2009) e pode, por outro lado, ativar a via alternativa por meio da clivagem do pró-fator D (DOBÓ et al., 2016). A proteína truncada MAp44 também inibe a ativação do complemento por competir por sítios de ligação, semelhantemente à MASP-3 (SKJOEDT et al., 2012).

Se, por um lado, a ativação do SC é necessária para eliminar patógenos, células apoptóticas, necróticas e malignas, por outro lado, ela pode ser potencialmente destrutiva para células autólogas, quando a sua ativação é exacerbada ou incontrolada. Por essa razão, a ativação do SC é fortemente controlada por diversos inibidores solúveis ou ligados à membrana celular. Entre esses reguladores, podemos destacar as proteínas plasmáticas H e a proteína ligante a C4b, e as de membrana celular CD46, CD55 e CD59. Os inibidores inibem a ativação espontânea do complemento, limitam a ativação benéfica do complemento ao local adequado e contribuem para a finalização da resposta do complemento (SCHMIDT; LAMBRIS; RICKLIN, 2016).

A proteína CD59 encontra-se ancorada por meio de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol na membrana plasmática (GPI) (DAVIES et al., 1989), onde bloqueia a formação do MAC. Quando ocorre a deposição de fatores do complemento na membrana celular, CD59 se liga ao complexo C5b-8, impedindo a ligação de C9 ao mesmo (NINOMIYA; SIMS, 1992). Dessa forma, CD59 tem um papel importante como protetor dos tecidos próprios contra a ação lítica do complemento, bem como de outros efeitos biológicos indesejados e mediados pelo MAC, como a liberação de citocinas pró-inflamatórias e pró-trombóticas e a liberação de fatores de crescimento.

Logo, o SC é composto por proteínas com funções opostas para que possa ocorrer uma resposta adequada e eficaz. Por um lado temos as proteínas ativadoras, como MASP-2, e por outro lado, as proteínas reguladoras, como CD59.

FIGURA 3. ATIVAÇÃO DA VIA DAS LECTINAS.



FONTE: O autor (2018), adaptado de BOLDT et al. (2017).

NOTA: A proteína MASP-2, ligada a uma molécula de reconhecimento padrão (PRM), é ativada quando o PRM se liga a um carboidrato ou resíduo acetilado presente na superfície de patógenos, células apoptóticas, necróticas ou malignas. Uma vez ativada, MASP-2 cliva C2 e C4. Os produtos C2a e C4b formam a enzima C3 convertase, que cliva C3. O produto C3b com C2a e C4b formam a C5 convertase. Essa enzima cliva C5, cujo produto C5b se liga à superfície de uma célula ou patógeno, seguido de C6, C7, C8, e, por fim, C9. O complexo C5b-C9 forma o complexo de ataque à membrana (MAC), que resulta na formação de um poro e lise celular. A proteína CD59, ancorada na membrana de células, pode se ligar ao complexo C5b-C8 e inibir a ligação de C9 e, consequentemente, a formação do MAC.

## 2.4 ESTRUTURA E FUNÇÃO DE MASP-2

A proteína MASP-2 é secretada como uma proenzima de cadeia única, também chamada de zimógeno. Ela é expressa, principalmente, pelos hepatócitos. As suas concentrações no soro ou plasma variam de 70 a 1200 ng/mL

(concentração média: 400-500 ng/mL) e permanecem estáveis ao longo da vida de um indivíduo saudável (MØLLER-KRISTENSEN et al., 2003; YTTING et al., 2007).

A ativação de MASP-2 ocorre com a quebra de uma ligação Arg-Ile (o peptídeo de ativação), resultando em mudanças de conformação e na formação de duas cadeias polipeptídicas: cadeia A (pesada) e cadeia B (leve), ligadas por uma ligação dissulfídica (THIEL, 2007). A cadeia A possui 429 resíduos de aminoácidos (52 kDa), enquanto que a cadeia B é formada por 242 resíduos (31 kDa) (THIEL et al., 1997).

A cadeia A compreende cinco domínios: o domínio N-terminal CUB1 (C1r/C1s, Uegf and bone morphogenetic protein-1), o domínio EGF (epidermal growth factor-like), o segundo domínio CUB, o CUB2, e dois módulos contíguos com proteína de controle do complemento, CCP1 (complement control protein module) e CCP2. Já a cadeia B, compreende uma serina protease, tipo quimotripsina (SP).

Como já mencionado anteriormente, homodímeros de MASP-2 zimógeno encontram-se complexados à PRMs. Os domínios SP dos dímeros sobressaem do complexo e são acessíveis para qualquer substrato adequado, incluindo domínios SP de zimógenos “vizinhos”, complexados a outros PRMs (KJAER et al., 2015; KJAER; THIEL; ANDERSEN, 2013).

Apesar de MASP-2 ser capaz de se autoativar *in vitro*, MASP-1 é essencial para sua ativação em condições fisiológicas. Uma vez ativada, MASP-2 se torna um ativador, tanto de zimógenos de MASP-2 como de MASP-1, por ativação cruzada de complexos PRM/MASP justapostos (DEGN et al., 2013; HEJA et al., 2012; KJAER et al., 2015). MASP-2 cliva os componentes do complemento C4 e C2, cujos produtos C4b e C2b se associam para formar a enzima C3 convertase, comum para a via das lectinas e a via clássica. Em comparação com C1s da via clássica, MASP-2 tem uma atividade catalítica 1000 vezes maior e é inibida 50 vezes mais rápida pelo inibidor C1 (KERR et al., 2008).

## 2.5 GENE E EXPRESSÃO DE MASP2

O gene *MASP2* codifica a serina protease MASP-2 e a proteína truncada MAp19 por processamento alternativo de um transcrito primário (BOLDT et al., 2013; THIEL et al., 1997). Ele está localizado na cadeia reversa do cromossomo 1p36.22, entre as coordenadas genômicas 1: 11,026,523-11,047,233 (human genome

version GRCh38), tem 12 exons e uma extensão de 22 kb. O exon 1 apresenta uma região não traduzida (5'UTR), o exon 2 codifica o peptídeo sinalizador e, juntamente com o exon 3, o domínio CUB1. O exon 4 codifica o domínio EGF. Já o exon 5 é alternativo e exclusivo para MAp19, codifica os quatro aminoácidos do domínio C-terminal, contém um códon de parada que leva ao término prematuro do processo de tradução e um sinal de poliadenilação, resultando assim em uma proteína truncada de 19 KDa (STOVER et al., 1999; TAKAHASHI et al., 1999). Os demais exons são específicos para os domínios de MASP-2: CUB2 (exons 6 e 7), CCP1 (exons 8 e 9), CCP2 (exons 10 e 11), e o domínio SP com o peptídeo de ativação (exon 12). A região não traduzida (3'UTR) nos exons 5 e 12 difere entre os dois mRNAs e, acredita-se, que poderia influenciar na estabilidade de ambos no citoplasma (FIGURA 4).

O gene *MASP2* é principalmente expresso no fígado, sendo MASP-2 sintetizada pelos hepatócitos e MAp19 pelas células de Kupffer (DEGN et al., 2011). As concentrações de mRNA de MAp19 são mais elevadas no fígado, comparados às de mRNA de MASP-2, com base em resultados de sequenciamento de RNA. Apesar disso, a síntese de mRNA de MAp19 é restrita a esse tecido, enquanto que o mRNA de MASP-2 também é encontrado no sistema nervoso e no trato reprodutivo (THE GTEX PORTAL, 2018). Além disso, o gene *MASP2* é expresso no citoplasma da maioria das células, sendo a principal localização o complexo de Golgi, e tem expressão distinta no colágeno e no plasma (THE HUMAN PROTEIN ATLAS, 2018).

O promotor de *MASP2* é regulado por STAT3, IL-1b e IL-6 (Unterberger et al. 2007), HNF4 (fator nuclear de hepatócitos alpha 4), e TCF7L2 (fator de transcrição 7-like 2) em células das linhagens mesodérmicas e ectodérmicas, respectivamente. Também é regulado por uma ilha CpG, que se estende até o exon 2. O exon 8 apresenta uma região regulatória forte com ilhas de CpG, que é reconhecida por diferentes proteínas, incluindo o fator CTCF, a proteína MAFK, as proteínas de reparo de DNA SMC3 e RAD21, e o supressor tumoral RUNX3. Os exons 5, 7 e 9 apresentam outras ilhas metiladas de CpG (ENCODE PROJECT CONSORTIUM, 2004).

## 2.6 VARIAÇÕES GENÉTICAS NO GENE *MASP2*

O gene *MASP2* é altamente polimórfico com 2882 variantes já descritas ao longo do gene. Apesar disso, apenas 182 apresentam MAF (minor allele frequency)  $\geq 1\%$ . Entre esses, aproximadamente 71% estão localizados em regiões intrônicas, 10,9% na sequência ascendente, 0,5% na região não traduzida 3', 8,8% em exons (sendo 38% variantes a montante), e 8,8% na região a jusante. SNP é o tipo de variante genética mais comum (83%), seguido por deleções (10%) e inserções (7%) (ENSEMBLE, 2018).

Em exons que codificam os domínios CUB1, EGF e serina protease, foram observados SNPs que podem alterar a função de MASP-2 (STENGAARD-PEDERSEN et al., 2003; THIEL et al., 2007, 2009; VALLÈS et al., 2009). Polimorfismos de *MASP2* também foram associados a modulações nas concentrações séricas de MASP-2 e MAp19.

Em 2003, deficiência hereditária de MASP-2 foi relatada pela primeira vez em um paciente com infecções recorrentes graves e doença autoimune. Análise de sequenciamento de DNA revelou uma mutação de ponto em homozigose no exon 3 (SNP *rs72550870:T>C*), causando uma substituição de glicina por um ácido aspártico no resíduo 120 (*p.D120G*) e alterando a função do domínio CUB1, tornando assim a proteína incapaz de se ligar a MBL e ficolinas e afetando a ativação do complemento (STENGAARD-PEDERSEN et al. 2003; SØRENSEN et al. 2005). Essa substituição afeta tanto as concentrações séricas de MASP-2 como de MAp19, resultando em concentrações reduzidas (SØRENSEN; THIEL; JENSENIUS, 2005).

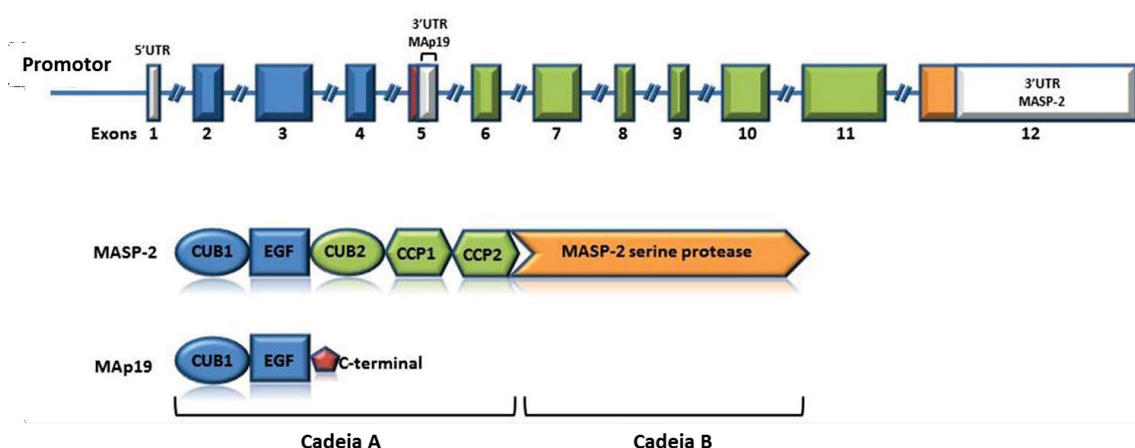
A variante *p.156\_159dupCHNH* é uma duplicação rara de quatro aminoácidos no domínio EGF, encontrada apenas na população chinesa. Foi associada com concentrações baixas de MASP-2, provavelmente, afetando a dimerização da proteína (THIEL et al., 2007, 2009). O SNP *rs12085877 G>A* resulta na substituição de uma arginina por uma histidina (*p.R439H*) no domínio SP de MASP-2, que resulta na redução da concentração de MASP-2 e da atividade enzimática de complexos MBL/MASP-2 (THIEL et al., 2007, 2009). Ainda mais, polimorfismos localizados no intron 9 e exon 10, que codifica o último domínio CCP, foram associados a diferentes concentrações de MASP-2 e MAp19 (BOLDT et al., 2011; THIEL et al., 2007; TULIO et al., 2011b). Porém, ainda não se sabe ao certo, como esses

polimorfismos alteram as concentrações das proteínas (BELTRAME et al., 2015; BOLDT et al., 2011; THIEL et al., 2007, 2009).

Boldt et al. (2011) descreveram 10 diferentes haplótipos do gene *MASP2*, cuja nomenclatura foi feita de acordo com as suas relações filogenéticas. Os cinco haplótipos que pertencem ao clado 1, compartilham o alelo *g.24762C* no exon 12. O haplótipo *\*1A*, é o mais ancestral, *\*1B1-h* e *\*1B2-h* foram associados a concentrações elevadas de MASP-2, enquanto que *\*1C1-l* e *\*1C2-l*, que compartilham o alelo que codifica o aminoácido *p.126L* foram associados com baixas concentrações de MASP-2, assim como também *\*1C2-l*, que codifica a variante *p.439H* que causa deficiência da proteína. Os outros cinco haplótipos, que apresentam o alelo *g.24762T* no exon 12, pertencem ao clado 2. Os haplótipos *\*2A1* e *\*2A2-l* contem a variante *p.377A*, associada a concentrações baixas de MASP-2, *\*2B1-i* e o haplótipo comum *\*2B2A-i* foram associados a concentrações intermediárias de MASP-2, já *2B2B-l* codifica a variante *p.120G* que causa deficiência de MASP-2 (BOLDT et al., 2011) (FIGURA 5).

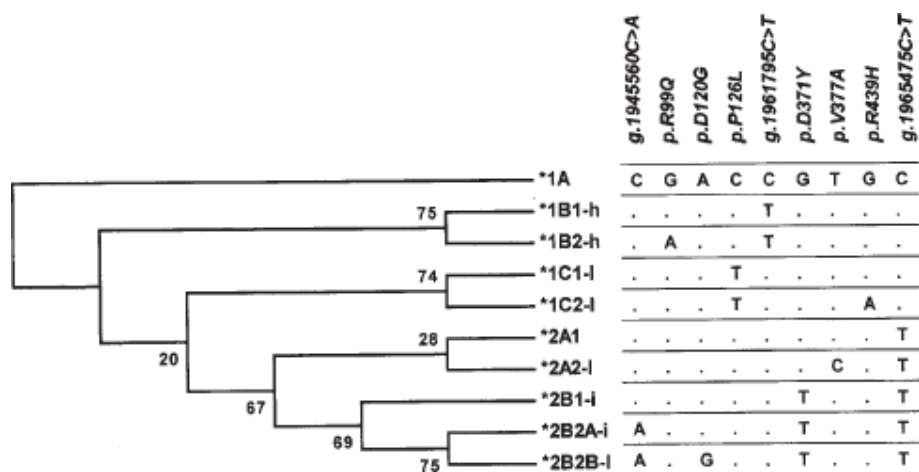
No Quadro 1, estão resumidos os SNPs que foram encontrados no gene *MASP2* e a sua associação com as concentrações de MASP-2.

FIGURA 4. GENE *MASP2* E OS PRODUTOS MASP-2 E MAP19.



FONTE: BOLDT et al., 2017.

NOTA: O gene *MASP2* é formado por 12 exons (retângulos). Os exons 2 a 4 (cor azul) codificam os domínios CUB1 e EGF de MASP-2 e MAP19, os exons 6 a 11 (cor verde) os domínios CUB1, CCP1 e CCP2, o exon 12 (cor laranja) o domínio serina protease de MASP-2, e o exon 5 o domínio C-terminal da MAP19.

FIGURA 5. HAPLÓTIPOS DE *MASP2*.

FONTE: Boldt et al. 2011.

NOTA: Ao lado dos haplótipos, está escrita a nomenclatura filogenética dada a eles. As posições, que correspondem aos SNPs, estão ilustradas (GenBank: NT\_021937, 1B, CAB50735).

## 2.7 DOENÇAS ASSOCIADAS A POLIMORFISMOS NO GENE *MASP2* OU À CONCENTRAÇÃO DE *MASP-2*

A proteína *MASP-2* é uma protease que, normalmente, encontra-se estável na circulação sanguínea. Entretanto, na presença de doenças, as concentrações dessa proteína podem sofrer alterações. Concentrações de *MASP-2* também podem ser moduladas por polimorfismos no gene *MASP2*. Assim como já foi observado com outras proteínas do SC, *MASP-2* pode apresentar um papel duplo no desenvolvimento de doenças. Por um lado, a sua deficiência pode resultar numa resposta imune deficiente, facilitando, por exemplo, a infecção por patógenos. Por outro lado, concentrações elevadas podem exacerbar a resposta inflamatória e levar a danos teciduais (BOLDT et al., 2016b). Portanto, a proteína *MASP-2* pode atuar como protetora ou potenciadora de doenças.

Foi observado, por exemplo, que a variante *p.D371Y* está associada com concentrações plasmáticas elevadas de *MASP-2* e com susceptibilidade para infecções causadas pelo vírus HCV (TULIO et al., 2011b). Já a variante *p.P126L*, foi associada com concentrações baixas de *MASP-2* (<200ng/mL) e com susceptibilidade para infecções causadas pelo vírus HIV (BOLDT et al. 2016b).

No Quadro 2, estão resumidas algumas doenças associadas à polimorfismos no gene *MASP2* ou à concentrações da proteína *MASP-2*.

## 2.8 CÂNCER ASSOCIADO À CONCENTRAÇÃO DE MASP-2

Sabe-se que o sistema imunológico exerce uma função importante no desenvolvimento de câncer. De acordo com estudos anteriores, ele desempenha um papel duplo: por um lado, pode auxiliar a controlar o crescimento tumoral, mas por outro lado, células imunes, principalmente do sistema imune inato, podem auxiliar na progressão tumoral. O sistema imune pode cooperar para que o tumor adquira características importantes para sua progressão. Devido ao processo inflamatório, o microambiente tumoral pode ser suprido de fatores de crescimento que sinalizam a proliferação celular, fatores que limitam a morte celular, fatores proangiogênicos, enzimas extracelulares que facilitam a angiogênese e favorecem a invasão para outros órgãos (COLOTTA et al., 2009; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; QIAN; POLLARD, 2010). Células inflamatórias podem ainda liberar substâncias que são mutagênicas para células vizinhas (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

Apesar da importância de MASP-2 na ativação do SC, ainda existem poucos estudos para esclarecer o seu papel na tumorigênese. Foi observado que concentração elevada de MASP-2 é um marcador favorável para câncer do fígado e concentração baixa da proteína foi associada a menor sobrevida em pacientes com esse tipo de câncer (THE HUMAN PROTEIN ATLAS, 2018). Curiosamente, o fígado é um dos principais órgãos que expressam o gene *MASP2*. É possível que a ativação aumentada de MASP-2 e, por conseguinte, do SC, favoreça a remoção de células malignas nesse órgão.

Por outro lado, em câncer colorretal (CCR), concentrações elevadas de MASP-2 foram associadas com maior risco para recorrência tumoral e menor sobrevida (YTTING et al., 2005). Ytting et al. (2005) observaram concentrações elevadas de MASP-2 em pacientes com CCR no período pré-operatório e perceberam que não estavam associadas a infecções no período pós-operatório. Várias hipóteses foram levantadas para explicar o envolvimento de MASP-2 em CCR: a ativação prolongada das vias de sinalização, devido à resposta inflamatória, poderia favorecer o desenvolvimento e crescimento tumoral; MASP-2 poderia facilitar a invasão tumoral, como já foi observado com outras proteases; ou ainda, MASP-2 poderia participar da via molecular que permite a comunicação entre as células cancerosas e inflamatórias, encontradas no microambiente tumoral. Foi sugerido também que tumores poderiam consumir MASP-2 e, assim, a proteína

funcionaria como inibidora do crescimento tumoral; ou ainda, que tumores agressivos poderiam sintetizar MASP-2 (YTTING et al., 2005).

Posteriormente, observou-se ainda nesse grupo de pacientes, que as concentrações séricas de MASP-2 não sofriam alterações significativas após a ressecção do tumor (YTTING et al., 2008) e que não havia associação entre as concentrações de MASP-2 e o alelo para *D120G* (associado a concentrações reduzidas de MASP-2) (YTTING et al., 2011). Portanto, é provável que em CCR, as concentrações de MASP-2 não sejam moduladas pelo tumor (YTTING et al., 2008), e sim, que pacientes com polimorfismos associados a concentrações elevadas de MASP-2, sejam propensos a um pior prognóstico.

Em carcinoma de células escamosas do esôfago, a expressão de MASP-2 também estava aumentada e foi associada com estágio clínico avançado e metástases nodais. A expressão da proteína já estava alterada em estágios pré-malignos (displasia) e foi sugerido que essa condição seria mantida durante a progressão da doença e estaria associada com o comportamento agressivo do tumor (VERMA et al., 2006). Além disso, a expressão aumentada de MASP-2 também foi notada em crianças com tumores no sistema nervoso central, com linfoma não-Hodgkin e com leucemia linfoblástica aguda (FISCH et al., 2011), e em pacientes com carcinoma papilar da tireoide (SHI et al. 2013).

Em mulheres com câncer do ovário, observou-se uma associação entre a doença e a expressão aumentada de *MASP2* mRNA em secções tumorais, porém não houve associação com as concentrações séricas de MASP-2 e com o alelo para *D120G*. No grupo de pacientes, não houve associação entre a expressão de *MASP2* e as concentrações séricas de MASP-2. Portanto, foi sugerido que as alterações na expressão de mRNA de *MASP2* poderiam estar envolvidos na patogênese do câncer ovariano e serem influenciados pela própria doença ou por polimorfismos genéticos no gene *MASP2*, que poderiam conferir um pior prognóstico para as pacientes (SWIERZKO et al., 2014).

Concluindo, percebe-se que MASP-2 pode ser tanto um marcador favorável, como desfavorável para câncer. Os mecanismos envolvidos ainda são pouco conhecidos. É possível que variações genéticas estejam associadas às alterações na concentração da proteína em câncer colorretal e ovariano. Porém, mais estudos são necessários para esclarecer essa hipótese e a relação entre a proteína MASP-2 e o desenvolvimento de câncer.

QUADRO 1. POLIMORFISMOS NO GENE MASP2 ASSOCIADOS À CONCENTRAÇÃO DE MASP-2.

dbSNP	Alelos	Região no gene	Posição do aminoácido	Domínio na proteína	MAF global	Concentrações das proteínas	Referência
rs7548659	G>T	Promotor	n.a.	n.a.	43%	Concentração elevada de MASP-2 e baixa de MAp19	Boldt et al 2013
rs61735600	C>T	Exon 3	p.R99Q	CUB1	2%	Concentração elevada de MASP-2	Thiel et al 2007
rs72550870	T>C	Exon 3	p.D120G	CUB1	1%	Concentração baixa de MASP-2 e MAp19	Sørensen et al 2005, Thiel 2007, Kristian Stengaard-Pedersen et al 2003, Boldt 2013.
rs56392418	C>T	Exon 3	p.P126L	CUB1	4%	Concentração baixa de MASP-2	Thiel et al 2009
-	c.466_477dup	Exon 4	p.156_159 dpCHNH	EGF	0.26%	Concentração baixa de MASP-2	Thiel et al 2007, 2009
rs2273343	T>C	Exon 4	p.H155R	EGF	1%	Concentração baixa de MASP-2	Thiel et al 2009
rs2273344	A>G	Intron 4	n.a.	n.a.	16%	Concentração elevada de MASP-2 e baixa de MAp19	Boldt et al 2013
rs9430347	G>A	Intron 5	n.a.	n.a.	15%	Concentração elevada de MASP-2 e baixa de MAp19	Boldt et al 2013
rs17409276	C>T	Intron 9	n.a.	n.a.	16%	Concentração elevada de MASP-2 e baixa de MAp19	Boldt et al 2013
rs12711521	G>T	Exon 10	p.D371Y	CCP2	42%	Concentração elevada de MASP-2 e baixa de MAp19	Boldt et al 2013
rs2273346	T>C	Exon 10	p.V377A	CCP2	12%	Concentração baixa de MASP-2	Thiel et al 2007, 2009

QUADRO 1. POLIMORFISMOS NO GENE MASP2 ASSOCIADOS À CONCENTRAÇÃO DE MASP-2. (cont.)

dbSNP	Alelo	Região no gene	Posição do aminoácido	Região na proteína	MAF global	Concentrações das proteínas	Referência
rs12085877	G>A	Exon 12	p.R439H	SP	3%	Concentração baixa de MASP-2	Thiel et al 2009
rs1782455	T>C	Exon 12	p.R439H	SP	31%	Concentração elevada de MASP-2 e baixa de MASP-19	Boldt et al 2013

FONTE: BELTRAME et al. 2015.

NOTA: n.a. - não aplicável.

QUADRO 2. DOENÇAS ASSOCIADAS A POLIMORFISMOS NO GENE MASP2 E/OU A CONCENTRAÇÕES DE MASP-2.

<b>Doença associada</b>	<b>Concentração no soro/plasma</b>	<b>Polimorfismo</b>	<b>Efeito</b>	<b>Referência</b>
Infarto subagudo do miocárdio	MASP-2 >	-	Concentrações alteradas em doenças vasculares	Frauenknecht et al 2013
Acidente vascular isquêmico agudo	MASP-2 <	-	Concentrações alteradas em doenças vasculares	Frauenknecht et al 2013
Diabetes mellitus do tipo 1	MASP-2 >	-	Favorece aumento de fatores trombóticos e complicações vasculares	Jenny et al 2015
Fibrose cística	-	rs850312 MASP1 L617L	Início precoce de colonização crônica por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Haerynck et al 2012
Infecção por pneumococo	MASP-2 <	p.D120G	Aumenta susceptibilidade	Ali et al., 2012 Stengaard-Pedersen 2003
Hanseníase	MASP-2 <	p.P126L p.R439H	Aumenta susceptibilidade e também a forma lepromatosa de hanseníase	Boldt et al., 2013
Tuberculose pulmonary	MASP-2 <	p.D120G p.V377A rs6695096 (intron 7)	Aumenta susceptibilidade	Sokolowska et al, 2015 Chen et al 2015
Infecções em crianças em estado crítico na UTI	MASP-2 <	-	Aumenta susceptibilidade para novas infecções	Ingels et al., 2014
Câncer pediátrico	MASP-2 <	-	Aumenta risco para episódios de febre e neutropenia severa induzida pela quimioterapia	Schlapbach et al 2007

QUADRO 2. DOENÇAS ASSOCIADAS A POLIMORFISMOS NO GENE MASP2 E/OU A CONCENTRAÇÕES DE MASP-2. (cont.)

<b>Doença associada</b>	<b>Concentrações no soro/plasma</b>	<b>Polimorfismo</b>	<b>Efeito</b>	<b>Referência</b>
Choque séptico	MASP-2 <	-	Diminuição aguda de MASP-2 durante a fase inicial poderia estar correlacionada com mortalidade	Charchafieh et al., 2012
Doença de Chagas	MASP-2 <	p.D371Y p.P126L p.V377A	Maior risco para cardiomiopatia chagásica	Boldt et al., 2011
Malária da placenta	MASP-2 <	p.R439H	Função protetora	Holmberg et al 2015
HIV	MASP-2 <	p.P126L	Aumenta susceptibilidade para infecções pelo HIV; efeito protetor contra AIDS	Boldt et al 2016
Hepatite C	MASP-2 >	p.D371Y	Susceptibilidade para infecção	Tulio et al. 2011
Infecção pelo vírus linfotrópico T humano	MASP-2 >	p.D371Y	Susceptibilidade para infecção	Coelho et al 2013
Infecções severas após quimioterapia	MASP-2 >	-	Aumenta risco para infecções em pacientes adultos com câncer hematológico	Ameye et al., 2012
Câncer pediátrico	MASP-2 >	-	Leucemia linfoblástica aguda, com linfoma não-Hodgkin e com tumores do sistema nervoso central	Fisch et al., 2011
Câncer colorretal	MASP-2 >		Sobrevida menor e recorrência tumoral após cirurgia	Yting et al 2008
Febre reumática	MASP-2 <	p.V377A p.R439H	Efeito protetor contra febre reumática e doença reumática cardíaca	Catarino et al., 2014

Artrite reumatóide	MA SP-2 <	<i>p.D120G</i>	Aumenta susceptibilidade para a doença e sintomas articulares	Goeldner et al 2014
Doença do pânico e bipolar; Esquizofrenia	MA SP-2 <	<i>p.R439H</i> -	Associação com autoimunidade	Foldager et al., 2012 and 2014

FONTE: BOLDT et al. (2017).

## 2.9 PROTEÍNA CD59

A proteína CD59, também conhecida como protectina, MIC11 ou MIRL (inibidor da lise reativa de membrana), é uma pequena proteína globular, altamente glicosilada, de aproximadamente 18 a 20 kDA, e que contem 128 aminoácidos (incluindo o peptídeo sinal). De acordo com o Human Protein Atlas, a principal localização de CD59 é intracelular, no complexo de Golgi e em vesículas (FIGURA 1). Ela também é encontrada ancorada à membrana celular de células próprias, por meio de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (DAVIES et al. 1989). Ainda não se sabe ao certo, se a forma intracelular de CD59 também está ligada a uma âncora de GPI ou não (KRUS et al., 2014).

Na membrana plasmática, CD59 encontra-se inserida em microdomínios com alta concentração de colesterol e de esfingolípidos, chamados de jangadas lipídicas (*lipid rafts*) (KIMBERLEY; SIVASANKAR; PAUL MORGAN, 2007). Esses microdomínios são como centros de concentração e de organização de receptores específicos e moléculas sinalizadoras, que podem influenciar a fluidez da membrana, a movimentação de proteínas da membrana e de receptores, bem como regular a neurotransmissão e a formação de sinapses imunológicas. Interessantemente, os *lipid rafts* aparecem também no meio intracelular, como no complexo de Golgi e em lisossomos, o que corrobora a alta expressão de CD59 nessas organelas.

CD59 é uma proteína multifuncional envolvida na regulação de diversos mecanismos celulares. Ela é principalmente conhecida pelo seu importante papel como inibidora da formação do MAC na membrana celular, e, portanto, como um importante regulador do sistema complemento (FIGURA 3). Como já mencionado anteriormente, essa proteína se liga ao complexo C5b-8 do MAC, impedindo a ligação de C9 e, conseqüentemente, a formação do poro na membrana e lise celular mediada pelo MAC (NINOMIYA; SIMS, 1992).

A formação do MAC na membrana plasmática pode, além de levar a lise celular, influenciar outros mecanismos celulares, como a proliferação celular e a secreção de mediadores proinflamatórios e protrombóticos (QIN et al., 2004). Portanto, CD59 pode atuar também como reguladora desses mecanismos. Em células endoteliais, por exemplo, a inserção do MAC resulta na liberação de fatores de crescimento que estimulam a proliferação celular e o crescimento tecidual.

Portanto, a deficiência de CD59 pode resultar na proliferação exacerbada desse tecido. Além disso, o MAC em concentrações baixas pode acionar mecanismos anti-apoptóticos na célula, levando a sua sobrevivência (NAUTA et al. 2002). Dessa forma, é possível que a presença de CD59 nas membranas celulares evite a apoptose da célula.

Apesar de sua importância na regulação do complemento, diversos estudos apontam para funções de CD59 que não dependem do complemento. Em concordância com a localização de CD59 em *lipid rafts*, esta apresenta propriedades sinalizadoras, como na liberação de cálcio pelas células e ativação de moléculas sinalizadoras como tirosina quinases (KIMBERLEY; SIVASANKAR; PAUL MORGAN, 2007).

Recentemente, foi demonstrado que existe uma forma intracelular de CD59 que atua na liberação de insulina pelas células  $\beta$  no pâncreas. Krus et al. (2014) observaram que a regulação negativa da expressão de CD59 com siRNA, diminuiu a habilidade das células  $\beta$  clonadas de rato, de secretar insulina sob estímulo de glucose. A remoção de CD59 com fosfolipase C (que cliva as âncoras de GPI), no entanto, não afetou a secreção de insulina, o que poderia indicar que CD59 intracelular estaria envolvida na liberação desse hormônio. Não se sabe ao certo se essa CD59 se liga a GPI ou não, até porque muitos anticorpos gerados para analisar CD59 reconhecem GPI.

O mecanismo pelo qual CD59 auxilia na liberação de insulina, não está bem esclarecido. Sabe-se que CD59 pode se associar a proteínas envolvidas na secreção de insulina para o meio extracelular. Além disso, CD59 foi encontrada associada a grânulos de insulina e foi observado que células com expressão atenuada dessa proteína, apresentaram menos eventos de fusão entre grânulos de insulina e a membrana celular (KRUS et al., 2014). Portanto, é possível que CD59 desempenhe um papel importante no processo de fusão entre os grânulos de insulina e a membrana celular.

A proteína CD59 parece desempenhar também um papel protetor na placenta, um órgão imunologicamente protegido. As proteínas reguladoras do complemento CD59, CD55 e MCP (membrane cofactor protein) são altamente expressas nas vilosidades normais da placenta. Sood et al. (2006) observaram que as maiores concentrações de CD55 e CD59 ocorrem no âmnio, seguido pelo corion e pelas vilosidades, enquanto que a MCP é expressa em concentrações maiores,

apenas nas vilosidades. Nas vilosidades, essas proteínas são expressas pelas células placentárias especializadas, os sinciciotrofoblastos, que entram em contato direto com o sangue materno. O âmnio, comparado ao córion, é notavelmente não imunogênico e não entra em contato direto com células maternas. Portanto, foi sugerido que o âmnio secreta os inibidores do complemento junto a exossomos, para dentro do líquido amniótico ou para as junções materno-fetais vizinhas (SOOD et al., 2006).

Diversos autores sugerem que CD59 pode atuar como supressor de células T, particularmente de células T CD4+. Em camundongos *knockout* para CD59, a resposta de células T CD8+ não sofreu alteração, enquanto que houve aumento da proliferação de células CD4+. A regulação de células T por CD59 parece ocorrer de forma independente do SC (LONGHI et al., 2005). Esses resultados corroboram o fato de pacientes com hemoglobinúria paroxística noturna (HPN), deficientes para CD59, apresentarem falha na resposta imune por células T (ROMAGNOLI; BRON, 1999). Não se sabe, ainda ao certo, de que forma CD59 inibe a ativação de células T, se ela possui um efeito direto sobre a célula ou indireto mediado pela modulação de *lipid rafts* (SUZUKI et al., 2012).

Foi observado ainda, que proteínas CD59 (e também CD55) são expressas na membrana de exossomos, que são liberados por células apresentadoras de antígenos (APCs). Os exossomos apresentam moléculas apresentadoras de antígenos HLA de classe II e, quando liberadas no meio extracelular, estimulam a resposta antígeno-específica mediada por células T CD4+ e CD8+. Na ausência de inibidores do complemento em exossomos, ocorre a deposição de C3b na sua superfície e lise celular mediada pelo complemento. Portanto, CD59 parece ter um papel protetor em exossomos, protegendo-os contra o ataque do complemento, para que eles possam, assim, desempenhar eficientemente a sua função (CLAYTON et al., 2003).

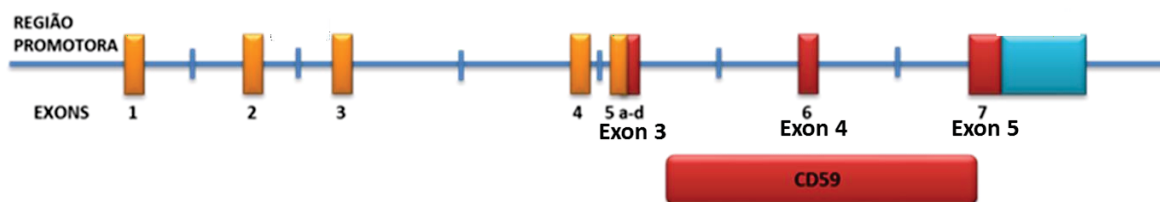
Entre outras funções de CD59, pode-se destacar ainda a indução de apoptose de células T CD4+, ativação, adesão e transdução de sinais entre células T e a ativação de neutrófilos (KIMBERLEY; SIVASANKAR; PAUL MORGAN, 2007; LONGHI et al., 2005; MONLEÓN et al., 2000).

## 2.10 GENE E EXPRESSÃO DE CD59

O gene *CD59* está localizado na cadeia reversa do cromossomo 11p14-p13 (FORSBERG et al., 1989), entre as coordenadas 11: 33,698,261-33,736,445 (GRCh38:CM000673.2). Com mais de 27 kb, *CD59* possui ao todo 10 exons (FIGURA 6), que codificam 14 transcritos por processamento alternativo (ENSEMBLE, 2018; PETRANKA et al., 1992), entre os quais 4 não são traduzidos e os outros 10 traduzem um único polipeptídeo (ENSEMBLE, 2018). O principal transcrito de *CD59* (*CD59-001*) é amplamente expresso nos tecidos, inclusive no colo do útero, e em células sanguíneas, seguido de *CD59-002*. Os demais transcritos não possuem expressão significativa (KIMBERLEY; SIVASANKAR; PAUL MORGAN, 2007).

O principal transcrito (*CD59-001*) compreende a proteína *CD59* do SC, que contém 128 aminoácidos e é codificada por apenas três exons: 3, 4 e 5, derivados dos exons 5c/d, 6 e 7 (FIGURA 6). Essa proteína é amplamente expressa em diversos tecidos. A expressão de *CD59* também foi analisada em diversas linhagens celulares e observou-se que a sua concentração era elevada em células endoteliais e de sarcomas, seguido de células da pele, fibroblastos e células cerebrais (UHLÉN et al., 2015).

FIGURA 6. GENE *CD59* E O PRODUTO *CD59*.



FONTE: O Autor (2018).

NOTA: O gene *CD59* é formado por 10 exons: exon 1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 5c, 5d, 6 e 7 (retângulos nas cores laranja e vermelho) e por uma região não traduzida 3' (retângulo azul). O transcrito que codifica a proteína *CD59* do SC, é formada por apenas 5 exons (referentes aos exons 1, 3, 5c/d, 6 e 8), sendo que os dois primeiros não são traduzidos.

## 2.11 VARIAÇÕES GENÉTICAS NO GENE *CD59*

De acordo com o Projeto Genoma Humano, já foram descritas 413.547 variantes genéticas no gene *CD59*, sendo que 223.678 estão localizadas em regiões intrônicas e 9581 em regiões não traduzidas. Algumas mutações são clinicamente conhecidas por causarem deficiência de *CD59* e levarem ao desenvolvimento de certas doenças. Apesar de serem bem conhecidas, são variantes raras na população.

Em algumas famílias de origem judaica, foi detectado um SNP raro no exon 3, o *rs397514767*. Este é responsável pela substituição de um aminoácido cisteína por uma tirosina (*p.Cys89Tyr*) e causa anemia hemolítica e polineuropatia imune. Deficiência de *CD59* também foi observada em indivíduos com uma deleção em homozigose de um nucleotídeo único no exon 5, o *rs587777149* (146delA). Essa deleção resulta em uma mudança no quadro de leitura e parada prematura na tradução da proteína, levando ao desenvolvimento de anemia hemolítica com polineuropatia imune (HÖCHSMANN; SCHREZENMEIER, 2015; NEVO et al., 2013).

Polimorfismos em regiões não traduzidas podem desempenhar um papel importante na regulação da transcrição do gene. Por se situarem em áreas reconhecidas por proteínas reguladoras, podem estar associados à acentuação ou inibição da transcrição de *CD59*. Já SNPs situados em regiões intrônicas, que flanqueiam exons alternativos, podem regular o processamento pós-transcricional de *CD59*.

Em pacientes com pênfigo foliáceo, foram analisados os seguintes SNPs nessas regiões de *CD59*: *rs704697* e *rs1047581* na região reguladora 3'UTR; *rs861256*, *rs831625* e *rs831629* no intron 3; e *rs704701* no intron 5. Após comparar as frequências alélicas e haplotípicas com a concentração de *CD59* mRNA, observou-se que o haplótipo GGCAA, formado pelos genótipos GG, CC e AA (em *cis* ou *trans*) dos SNPs *rs831625*, *rs704701* e *rs704697*, respectivamente, estava associado à maior expressão de mRNA ( $p=0.037$ ), especialmente em mulheres ( $p=0.029$ ). Esse haplótipo também foi associado à susceptibilidade para PF. Da mesma forma, o alelo G de *rs861256* foi associado com aumento da expressão gênica e maior risco para PF (SALVIANO-SILVA; PETZL-ERLER; BOLDT, 2017). Porém, os mecanismos envolvidos ainda precisam ser esclarecidos.

## 2.12 DOENÇAS ASSOCIADAS À EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CD59

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma doença causada por uma mutação clonal em células-tronco hematopoéticas (CTH) num gene que codifica uma proteína importante da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Essa mutação resulta na síntese de âncoras de GPI truncadas, o que resulta na regulação negativa e na falha de função de proteínas ligadas à membrana por meio delas.

Entre as proteínas ligadas à membrana por GPI estão a CD55 e CD59, reguladoras do SC. Os eritrócitos são particularmente vulneráveis à ação do SC (ZALMAN et al., 1987). A deficiência de CD59, com influência menor de CD55, resultam na lise dos eritrócitos e, conseqüentemente, em hemoglobinúria, anemia e trombose, sintomas característicos da doença. O quadro clínico é bastante variável e inclui infecções recorrentes. Além disso, a doença pode surgir em associação com outras, como anemia aplásica e síndrome mielodisplásica (ARRUDA et al., 2010). O tratamento de HPN pode ser realizado com sucesso utilizando o eculizumab, um anticorpo que se liga ao C5 e previne a sua clivagem e ativação, inibindo, dessa forma, a formação do MAC (HILLMEN et al., 2004; KAPLAN, 2002).

Além de hemólise crônica, outra doença rara observada em alguns pacientes com deficiência completa de CD59, é a neuropatia desmielinizante grave, que afeta predominantemente a parte motora já na infância, e pode ser recorrente e aguda. Crianças com esse quadro também podem ser tratadas com eculizumab (MEVORACH et al., 2016).

Em pacientes com diabetes, a hiperglicemia pode levar a glicosilação de CD59, o que resulta na perda de sua função e, conseqüentemente, no desenvolvimento de complicações vasculares. Células endoteliais têm expressão elevada de CD59 na sua membrana. Portanto, a deficiência dessa proteína pode aumentar a lise celular e a liberação de fatores de crescimento, de citocinas próinflamatórias e protrombóticas (mediados pelo MAC) no tecido endotelial. A soma desses fatores leva ao comprometimento dos vasos sanguíneos e ao desenvolvimento de doenças vasculares (ACOSTA et al., 2000).

Outros estudos confirmaram o envolvimento de CD59 em diabetes. Em órgãos afetados pela doença, detectou-se CD59 glicada e a deposição de MAC nas células. Foi observado também que eritrócitos de pacientes diabéticos com alta concentração de hemoglobina glicada eram mais sensíveis à lise celular mediada

pelo MAC comparado a eritrócitos de indivíduos saudáveis (QIN et al., 2004). O aumento da deposição de MAC também foi observado em rins de pacientes com nefropatia diabética (FALK et al., 1987). Além disso, em um estudo com ratos, foi demonstrado que CD59 é um protetor contra aterosclerose (WU et al., 2009) e que em ratos com diabetes induzida, a deficiência de CD59 acelera o desenvolvimento de aterosclerose (LIU et al., 2017).

Ainda, em pacientes com diabetes, a deficiência de CD59 não ocorre apenas no tecido endotelial. Krus et al. (2004) observaram em modelos animais de diabetes que a expressão de CD59 estava reduzida nas ilhotas pancreáticas (ou ilhotas de Langerhans). Assim como já mencionado anteriormente, CD59 desempenha um papel importante na liberação de insulina pelas células  $\beta$  no pâncreas e, portanto, a sua deficiência poderia diminuir a secreção desse hormônio e levar ao aumento da concentração de glicose no sangue.

Deficiência de CD59 também foi observada em doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico (ALEGRETTI et al., 2012), neuromielite ótica e esclerose múltipla (UZAWA et al., 2016), artrite reumatoide (KINDERLERER et al., 2006) e polineuropatias imunes (NEVO et al., 2013). Em artrite reumatoide, a expressão de CD59 estava reduzida no líquido sinovial em comparação com tecido não inflamado. Num modelo de artrite em murinos, observou-se que deficiência de CD59 aumentou a gravidade da doença, o que pôde ser revertido com CD59 recombinante (KONTTINEN et al., 1996; WILLIAMS et al., 2004). Ambos os estudos indicam que CD59 desempenha um papel importante em junções ósseas.

A ativação exacerbada do SC no sistema nervoso pode resultar em neurodegeneração. Na doença de Alzheimer, por exemplo, fatores do complemento foram encontrados em placas de amiloide e em amiloide vascular cerebral já nos estágios iniciais. A ativação descontrolada do complemento poderia ocasionar danos à mielina e aos axônios (HÖCHSMANN; SCHREZENMEIER, 2015; NEVO et al., 2013). A deficiência de CD59 foi observada em pacientes com doença de Alzheimer, o que poderia diminuir a proteção das células neuronais contra a ação do SC (YANG et al., 2000). Interessantemente, a região da membrana onde CD59 está inserida, os *lipids rafts*, participa da regulação de sinapses neuronais. Portanto, é possível que a deficiência de CD59 poderia influenciar na fisiopatologia da doença, inclusive por mecanismos independentes do SC.

Alguns tipos virais envelopados se utilizam de proteínas reguladoras do complemento, como CD59, para se proteger da ação do SC, incorporando-as à superfície do seu envelope. Esse mecanismo de proteção é utilizado pelo vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1), citomegalovírus, vírus herpes 1 (HSV-1), Ebola vírus, vaccínia vírus, vírus Influenza e vírus da Hepatite C (HCV) (AMET et al., 2012). CD59 incorporada à superfície desses vírus deriva, provavelmente, da membrana de células do hospedeiro e é ligada a uma âncora GPI. Isso foi observado em um estudo com células infectadas por HIV-1. Também se observou que deficiência de GPI atenuou a produção de HIV-1 infectante e sensibilizou os vírions ao ataque do complemento (AMET et al., 2016).

### 2.13 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CD59 EM CÉLULAS TUMORAIS

A expressão de CD59 já foi analisada em diversas células tumorais. Foi observado que a sua expressão estava aumentada em células de câncer pulmonar (LI et al., 2013), câncer do colo (SHANG et al., 2014), câncer da cabeça e do pescoço (KESSELRING et al., 2014), carcinoma seroso do útero (BELLONE et al., 2012), câncer de mama (OUYANG et al., 2016), e de outros tumores sólidos. Kesselring et al. (2014) observaram em células de câncer de cabeça e pescoço que o próprio microambiente tumoral regula a expressão de inibidores do complemento e aumenta a resistência dos tecidos que envolvem o tumor, à ação do SC. Em células de câncer do colo, foi encontrada uma correlação entre os níveis de expressão de CD55 e CD59 e o grau de diferenciação celular (SHANG et al., 2014). Portanto, pode-se dizer que células tumorais aumentam a expressão de CD59 (e de outros reguladores do complemento) como mecanismo de defesa contra a ação lítica do complemento, e que níveis aumentados de CD59 em células tumorais conferem um pior prognóstico aos pacientes.

A expressão de CD59 também foi analisada por Uhlen et al. (2005) em 20 diferentes tecidos tumorais, utilizando métodos de coloração com anticorpos consistentes com a expressão de RNA (HPA026494 e CAB001448). Todos os tecidos expressaram CD59. Vários casos de melanoma e alguns tipos de câncer urotelial apresentaram forte imunorreatividade. Já os casos de câncer de próstata, carcinoide, glioma, linfoma e câncer de testículo, foram negativos em geral. Já os testes realizados com o anticorpo CAB001448 indicaram positividade citoplasmática

moderada com positividade membranosa adicional nos cânceres de mama, urotelial, pancreático, de pele, pulmonar, do endométrio, melanomas e carcinoides. Os linfomas e seminomas (um tipo de câncer nos testículos) foram negativos.

Ainda, a expressão elevada de CD59 foi um marcador desfavorável para tempo de sobrevida para pacientes com câncer do pâncreas, câncer da cabeça e pescoço, câncer do estômago e também para câncer do colo do útero; porém, favorável para câncer renal. Entre as pacientes com câncer do colo do útero e com expressão elevada de CD59, apenas 42% tiveram sobrevida de 5 anos, enquanto que entre as pacientes com baixa expressão de CD59, 71% tiveram sobrevida de 5 anos (UHLÉN et al., 2005).

Além de inibir a citotoxicidade celular mediada pelo complemento, CD59 pode diminuir a citotoxicidade mediada por anticorpos monoclonais utilizados no tratamento de pacientes oncológicos, que apresentam expressão aumentada do receptor HER2/neu. Esse receptor participa da modulação de vários efeitos biológicos, como proliferação, sobrevida, migração e diferenciação celular, e a sua expressão exacerbada foi associada com pior prognóstico. Portanto, anticorpos monoclonais direcionados para esse receptor foram desenvolvidos para o tratamento do câncer (MAMIDI et al., 2013). Observou-se que a expressão aumentada de reguladores do SC (CD59, CD55 e CD46) por células tumorais com expressão positiva de HER2, confere resistência para as células contra a ação dos imunoterápicos. A inibição de CD59 aumentou a citotoxicidade celular mediada tanto pelo MAC como pelos imunoterápicos. Dessa forma, CD59 tem sido visto como um alvo potente para o desenvolvimento de novos tratamentos para câncer (BELLONE et al., 2012).

Além dos estudos mencionados acima, podemos destacar ainda que o silenciamento de CD59 em células de câncer de mama inibiu o crescimento celular tanto *in vitro*, como *in vivo* (OUYANG et al., 2016b), e, em células de câncer pulmonar, aumentou a apoptose mediado pelo MAC e também inibiu o crescimento celular (LI et al., 2013).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CASUÍSTICA

Esse estudo foi realizado com mulheres que tem ou tiveram diagnóstico de NIC 2, NIC 3 ou câncer do colo do útero. Não incluímos pacientes com NIC 1. Não incluímos mulheres da população indígena, dadas as suas particularidades contempladas na Resolução Complementar do Conselho Nacional de Saúde/CNS. Não foram feitas restrições quanto à cor/raça, orientação sexual, escolaridade, classes e grupos sociais.

Para investigar se há associação entre os SNPs nos genes *MASP2* e *CD59* e a doença, foram utilizadas amostras de DNA de mulheres saudáveis, incluídas em dois grupos de comparação: o grupo de comparação I (para análise do gene *MASP2*) e o grupo de comparação II (para análise do gene *CD59*) (FIGURA 7).

Utilizamos critérios como auto declaração e avaliação de características físicas para classificar os participantes do estudo em dois grupos: brancos e pardos/negros.

##### 3.1.1 Mulheres com NIC de alto grau

Os SNPs nos genes *MASP2* e *CD59* foram analisados em amostras de DNA genômico de mulheres com NIC 2 e 3. Essas amostras foram provenientes do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da Universidade Federal do Paraná (LIGH-UFPR), mediante colaboração com a Professora Maria da Graça Bicalho.

O projeto de pesquisa para a coleta dessas amostras foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Erasto Gaertner (CEP: 81520-0600), com o número de protocolo 1943. Todas as mulheres assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As mulheres com NIC de alto grau eram pacientes atendidas pelo Hospital Erasto Gaertner (Curitiba, PR), e foram convidadas nesse local para participarem do estudo.

Foram incluídas apenas pacientes com diagnóstico confirmado para NIC 2 ou NIC 3. Não foram incluídas mulheres que tiveram relação sexual em até 24 horas antes da coleta, que apresentaram algum exame de citologia cervical alterado

previamente, ou que já haviam sido submetidas ao procedimento de cauterização no colo do útero.

FIGURA 7. FLUXOGRAMA DOS GRUPOS AMOSTRAIS DO ESTUDO.



FONTE: O Autor (2018).

### 3.1.2 Mulheres com câncer do colo do útero

Os SNPs nos genes *MASP2* e *CD59* também foram analisados em DNA genômico de mulheres com/ou que tiveram câncer do colo do útero. A maioria das pacientes já havia passado pelo tratamento do câncer e, no momento da coleta, estava aguardando consulta médica para seguimento da doença no Hospital Erasto

Gaertner (Curitiba, PR). Foram incluídas mulheres que tem ou tiveram carcinoma *in situ*, carcinoma microinvasor, carcinoma invasor ou adenocarcinoma, com idade igual ou superior a 18 anos no momento da coleta.

Foi realizada uma entrevista, seguindo um modelo de questionário (APÊNDICE 1), e coleta de sangue para posterior extração de DNA. O projeto desse estudo foi analisado pelo Comitê de Ética do Hospital Erasto Gaertner (CAAE: 62542616.7.3001.0096), número do protocolo: 125417/2016. Todas as mulheres assinaram o TCLE (APÊNDICE A).

### 3.1.3 Grupo de comparação I

Para a investigação de associação entre os SNPs no gene *MASP2* com NIC de alto grau e câncer do colo do útero, utilizou-se amostras de DNA genômico, obtidas a partir de amostras de sangue coletadas de mulheres que, em sua maioria, foram doadoras de sangue em um banco de sangue de Curitiba (PR) (BOLDT et al., 2011). As amostras de DNA foram provenientes do Laboratório de Imunopatologia Molecular (HC/UFPR). As mulheres desse grupo tinham idade igual ou superior a 18 anos no momento da coleta. Não foram feitas restrições quanto à cor/raça, ancestralidade, orientação sexual, escolaridade, classes e grupos sociais.

A coleta das amostras de sangue foi realizada após a aprovação de um projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da UFPR, com o número CEP/HC 1409.074/2007-04. Todas as mulheres desse grupo assinaram o TCLE.

### 3.1.4 Grupo de comparação II

Para a investigação de uma possível associação entre SNPs no gene *CD59* e NIC de alto grau e câncer cervical, utilizou-se amostras de DNA genômico, extraído de amostras de sangue coletadas de mulheres saudáveis, que trabalhavam ou acompanhavam pacientes em hospitais localizados nas cidades Campo Grande (MS), Uberaba (MG), Ribeirão Preto (SP) e Curitiba (PR) (SALVIANO-SILVA; PETZL-ERLER; BOLDT, 2017). As amostras de DNA foram provenientes do Laboratório de Genética Humana da UFPR. O projeto de estudo para a coleta dessas amostras foi aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

(CONEP), com o número de protocolo 505.88. Todas as mulheres assinaram o TCLE.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Coleta de Material

#### 3.2.1.1 Coleta de dados

A coleta de dados foi realizada por meio de entrevistas com as mulheres com NIC 2, 3 e com câncer do colo do útero, seguindo um modelo de questionário (APÊNDICE 2), e por meio de pesquisa em prontuários eletrônicos.

#### 3.2.1.2 Coleta de sangue

Foi realizada coleta de sangue de pacientes com ou que tiveram câncer do colo do útero no Hospital Erasto Gaertner. Foram coletados de 12 a 15 mL de sangue periférico: 4-5 mL em tubos contendo EDTA e 8-10 mL em tubos sem anticoagulante. As amostras foram levadas ao Laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital de Clínicas - UFPR para separação do anel de leucócitos, do soro e do plasma. O anel de leucócitos foi utilizado para extração de DNA, enquanto que o soro e plasma foram armazenados num congelador e poderão ser usados para análise de proteínas.

#### 3.2.2 Extração de DNA

As amostras de DNA genômico foram extraídas de leucócitos contidos nos anéis leucocitários, obtidos após a centrifugação das amostras de sangue. A extração de DNA compreende o processo de lise celular, precipitação de proteínas, lise nuclear e ressuspensão do DNA. As técnicas utilizadas foram: salting-out, para as amostras das mulheres com NIC 2 e 3; uso do kit de extração QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) e do equipamento QIAcube (Qiagen), seguindo o manual de uso, para as amostras das mulheres com câncer cervical; uso do kit Wizard Genomic da Promega (Madison, WI - USA), seguindo as instruções de uso, para as amostras

do grupo de comparação I; e extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, para as amostras do grupo de comparação II.

Após a extração de DNA, as amostras foram hidratadas com água ou tampão (do kit QIAmp) e armazenadas em um congelador a temperatura de -20°C, prontas para uso. A quantificação e análise da pureza do DNA foram realizadas utilizando um espectrofotômetro.

### 3.2.3 PCR-SSP

A análise de SNPs nos genes *MASP2* e *CD59* foi realizada por meio da técnica PCR-SSP multiplex. A PCR-SSP é uma técnica que visa amplificar fragmentos curtos do genoma até um nível suficiente que permita a sua visualização. O objetivo é a distinção de alelos individuais, o que na prática é muito importante quando se deseja investigar se uma determinada doença ou característica, de um indivíduo ou população, está associada a uma variante genética ou não. Para tal, é necessário conhecer a sequência flanqueadora da região onde a variante está inserida. Iniciadores (ou *primers*) de 18 a 22 nucleotídeos são projetados para finalizar no nucleotídeo variante da fita-molde. A tipagem SSP baseia-se na premissa de que, se não houver complementaridade perfeita entre o último nucleotídeo do iniciador e da fita-molde, não há amplificação da sequência desejada. A PCR-SSP multiplex permite a análise de mais de um SNP numa mesma reação, o que diminui a quantidade de reagentes, materiais, energia e tempo consumidos para a sua análise.

No gene *MASP2*, foram haplotipados sete SNPs (QUADRO 3), utilizando 3 reações de amplificação. Esses SNPs, distribuídos ao longo dos introns 4 e 5, e exons 9, 10 e 12 (FIGURA 8), foram selecionados devido a associação encontrada entre eles e alterações nas concentrações da proteína MASP-2, em estudos anteriores (QUADRO 1). Utilizamos a nomenclatura dos alelos para identifica-los nesse estudo.

QUADRO 3. SNPS DE MASP2 ANALISADOS NO ESTUDO.

<i>NG007289.1</i>	<i>DbSNP</i>	<i>Região</i>	<i>NP_006601.2</i>
<i>Alelo</i>		<i>no gene</i>	<i>Aminoácido</i>
<i>g.7164 A&gt;G</i>	<i>rs2273344</i>	Intron 4	n.a.
<i>g.7441 G&gt;A</i>	<i>rs9430347</i>	Intron 5	n.a.
<i>g.21081 C&gt;T</i>	<i>rs17409276</i>	Intron 9	n.a.
<i>g.21370 G&gt;T</i>	<i>rs12711521</i>	Exon 10	p.Y371D
<i>g.21389 T&gt;C</i>	<i>rs2273346</i>	Exon 10	p.V377A
<i>g.24599 G&gt;A</i>	<i>rs12085877</i>	Exon 12	p.R439H
<i>g.24762 T&gt;C</i>	<i>rs1782455</i>	Exon 12	p.S493

FONTE: O autor (2018).

FIGURA 8. LOCALIZAÇÃO DOS SNPS NO GENE MASP2.

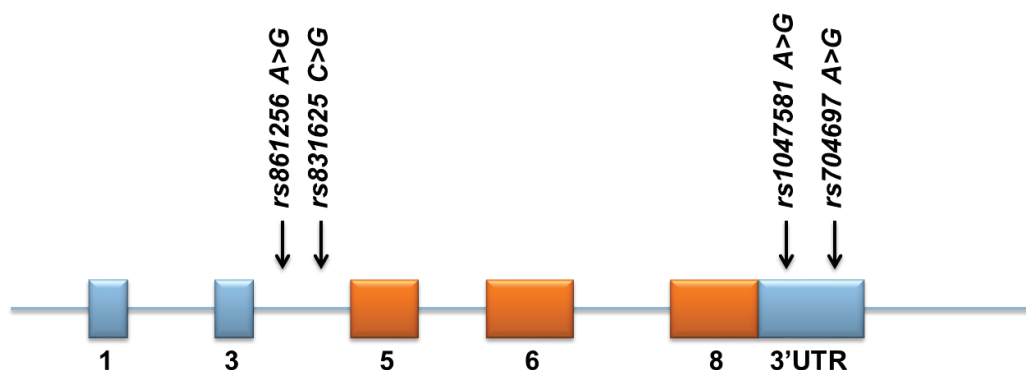


FONTE: O autor (2018), adaptado de BOLDT et al. (2017).

NOTA: As flechas indicam a localização dos SNPs no gene *MASP2*. Os retângulos representam os exons e os espaços entre eles, os introns. De acordo com a cor dos exons, é possível visualizar os domínios da proteína MASP-2 que codificam (abaixo do gene).

Para a análise do gene *CD59*, foram selecionados quatro SNPs localizados no intron 3 (*rs861256 A>G*, *rs831625 C>G*) e na região não traduzida 3' (*rs704697 A>G* e *rs1047581 A>G*) (FIGURA 9), descritos anteriormente por Salviano-Silva et al. (2016). Utilizamos a nomenclatura do SNP (dbSNP) para identificá-los no estudo.

Os SNPs no intron 3 foram selecionados com a premissa de que poderiam influenciar o processamento transcricional de mRNA, por flanquearem o exon 3 alternativo (presente na principal isoforma de *CD59*) e o exon codificante 5. Já os SNPs localizados na região reguladora 3'UTR poderiam diminuir a expressão de *CD59*, devido a importância dessa região na regulação da expressão gênica e na estabilidade dos transcritos. Esses SNPs apresentam MAF > 5% em populações europeias, africanas e ameríndias, de acordo com o Projeto 1000 Genomas.

FIGURA 9. LOCALIZAÇÃO DOS SNPS NO mRNA DE *CD59*.

FONTE: O autor (2018).

NOTA: Ilustração do mRNA de *CD59* com a localização dos SNPs investigados (indicadas pelas flechas). Esse transcrito, após processamento, permanece com os exons 1, 3, 5, 6 e 8 do gene *CD59*, sendo que o exon 3 (correspondente ao exon 2 do mRNA) é um exon alternativo, presente na principal isoforma (*CD59-001*). Os retângulos representam os exons e os espaços entre eles, os introns. Os retângulos de cor laranja representam os exons que codificam o polipeptídeo *CD59*.

Os iniciadores específicos projetados para cada SNP analisado nesse estudo, podem ser visualizados nos Quadros 4 (*MASP2*) e 5 (*CD59*). Como já mencionado anteriormente, foram realizadas três reações para analisar os SNPs de *MASP2* (QUADRO 6, 7 e 8) e uma reação para analisar os SNPs de *CD59* (QUADRO 9). Para o preparo de cada reação de PCR, foram adicionados os iniciadores específicos diretos (f) e reversos (r), um par de iniciadores genéricos que amplificam o controle endógeno da reação, TaqDNA polimerase (catalisadora da extensão dos iniciadores), dNTP (os desoxinucleotídeos A, T, G e C), tampão, cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), glicerol e água.

As concentrações dos reagentes foram testadas e adaptadas para cada reação. Através do controle endógeno é possível avaliar a qualidade da reação e do DNA. Cada PCR foi acompanhada por controles negativos, que são soluções de reação completas, sem o DNA.

Após o preparo, as reações foram colocadas em um termociclador, onde o DNA passa pelos processos de desnaturação das cadeias, acoplamento dos iniciadores e amplificação (alongamento da cadeia pela Taq polimerase). A PCR é realizada em aproximadamente 30 a 33 ciclos. Cada ciclo inicia com  $94^{\circ}C$  por 20 segundos, para desnaturação das cadeias de DNA; em seguida, ocorre o acoplamento dos iniciadores às fitas moldes, por 30 segundos, com temperaturas específicas para cada reação; o ciclo é, então, finalizado a  $72^{\circ}C$  por 30 segundos.

Para aumentar a especificidade das amplificações, as temperaturas de acoplamento foram testadas e ajustadas para cada reação. Utilizamos um método “touchdown”, no qual a temperatura de acoplamento diminui ao longo da PCR, o que diminui amplificações de sequencias não específicas.

As temperaturas de acoplamento das 3 reações de PCR para *MASP2* foram: 70º, 68º e 66ºC (com iniciadores para intron 4 e 5); 60º, 56º e 52ºC (com iniciadores para intron 9 e exon 10); e 62º, 58º e 54º (com iniciadores para o intron 9 e exons 10 e 12). Para a PCR com iniciadores específicos para CD59, as temperaturas de acoplamento foram: 62º, 60º e 56ºC.

QUADRO 4. INICIADORES PARA ANÁLISE DOS SNPS NO GENE *MASP2*.

<b>SNP</b>	<b>Iniciador</b>	<b>Seqüência 5´-3´</b>
<i>rs2273344</i>	Intr4_rs2273344Gf	GTTCCCTGCACTGTGGGACG
	Intr4_rs2273344Af	GTTCCCTGCACTGTGGGACA
<i>rs9430347</i>	Intr5_rs9430347Ar	CTCCCACCCCAGAGACACGT
	Intr5_rs9430347Gr	CTCCCACCCCAGAGACACGC
<i>rs17409276</i>	Intr9_+16060Cf	CAGCACACCTCTTCCTCC
	Intr9_+16060Tf	CAGCACACCTCTTCCTCT
<i>rs12711521</i>	Ex10_371Yr	TCGGCCACTGGGTAGATA
	Ex10_371Dr	TCGGCCACTGGGTAGATC
<i>rs2273346</i>	Ex10_377Vr	GGACCTGTGATGTACTCCA
	Ex10_377Ar	GACCTGTGATGTACTCCG
<i>rs12085877</i>	Ex12_439Rf	TGTGGACTATCAGCCCG
	Ex12_439Hf	TGTGGACTATCAGCCCA
<i>rs1782455</i>	Ex12_S493Cr	ATTCGAATGTCCAGGGCG
	Ex12_S493Tr	ATTCGAATGTCCAGGGCA

NOTA: f - iniciador direto; r - iniciador reverso.

QUADRO 5. INICIADORES PARA ANÁLISE DOS SNPS NO GENE *CD59*.

<b>SNP</b>	<b>Iniciador</b>	<b>Seqüência 5'-3'</b>
<i>rs861256</i>	In3_rs861256_Gf	CATTACTTTTCCTGGCTATGCG
	In3_rs861256_Af	CATTACTTTTCCTGGCTATGCA
<i>rs831625</i>	In3_rs831625Gr	CAAGGTTCGGGCTGTTCC
	In3_rs831625Cr	CAAGGTTCGGGCTGTTCCG
<i>rs704701</i>	3'UTR_rs704701Ar	AAACTTCAGCCGCCGAT
	3'UTR_rs704701Cr	AAACTTCAGCCGCCGAG
<i>rs1047581</i>	3UTR_rs1047581Gf	AGTGGAGAGGTAGGTGACG
	3UTR_rs1047581Af	AGTGGAGAGGTAGGTGACA

NOTA: In3 - Intron 3; f - iniciador direto; r - iniciador reverso.

QUADRO 6. PROTOCOLO PARA A REAÇÃO DE PCR-SSP MULTIPLEX COM INICIADORES PARA OS SNPS NOS INTRONS 4 E 5 DO GENE *MASP2*.

<b>Reagentes</b>	<b>[Final]</b>	<b>Vol. (ul)</b>
Tampão (x)	1	1,5
Glicerol	0,5%	0,75
MgCl <sub>2</sub> (mM)	0	0
dNTP (mM)	0,2	0,12
Iniciador genérico f	0,4	0,6
Iniciador genérico r	0,4	0,6
Iniciador <i>MASP2</i> In4_Gf/Af (uM)	0,15	0,2
Iniciador <i>MASP2</i> In5_Ar/Gr (uM)	0,1	0,2
Taq (U/ul)	0,02	0,06
DNA		1
H <sub>2</sub> O		9,545
Total		15

NOTA: f - iniciador direto; r - iniciador reverso.

QUADRO 7. PROTOCOLO PARA A REAÇÃO DE PCR-SSP MULTIPLEX COM INICIADORES PARA OS SNPS NO INTRON 9 E NOS EXONS 10 E 12 DO GENE *MASP2*.

<b>Reagentes</b>	<b>[Final]</b>	<b>Vol. (ul)</b>
Tampão	1	1,5
Glicerol	1,5%	2,25
MgCl <sub>2</sub> (mM)	0,25	0,15
dNTP (mM)	0,2	0,12
Iniciadores genéricos f/r (uM)	0,2	0,3
Iniciador <i>MASP2</i> In9_Cf/Tf (uM)	0,2	0,3
Iniciador <i>MASP2</i> Ex10_Ar/Vr (uM)	0,2	0,3
Iniciador <i>MASP2</i> Ex12_Rf/Qf (uM)	0,2	0,3
Iniciador <i>MASP2</i> Ex12_Pr/Lr (uM)	0,2	0,3
Taq (U/ul)	0,02	0,06
DNA		1
H <sub>2</sub> O		7,22
Total		15

NOTA: f - iniciador direto; r - iniciador reverso.

QUADRO 8. PROTOCOLO PARA A REAÇÃO DE PCR-SSP MULTIPLEX COM INICIADORES PARA OS SNPS NO INTRON 3 DO GENE *CD59*.

<b>Reagentes</b>	<b>[Final]</b>	<b>Vol. (ml)</b>
Tampão	1	1
dNTP (mM)	0,2	1
Iniciador genérico f	0,1	0,1
Iniciador genérico r	0,1	0,1
Iniciador <i>CD59</i> In2_Gf	0,7	0,7
Iniciador <i>CD59</i> In2_Af	0,7	0,7
Iniciador <i>CD59</i> In2_Gr	0,3	0,3
Iniciador <i>CD59</i> In2_Cr	0,3	0,3
Taq (U/ml)	0,04	0,08
DNA		1
H <sub>2</sub> O		4,72
Total		10

NOTA: f - iniciador direto; r - iniciador reverso.

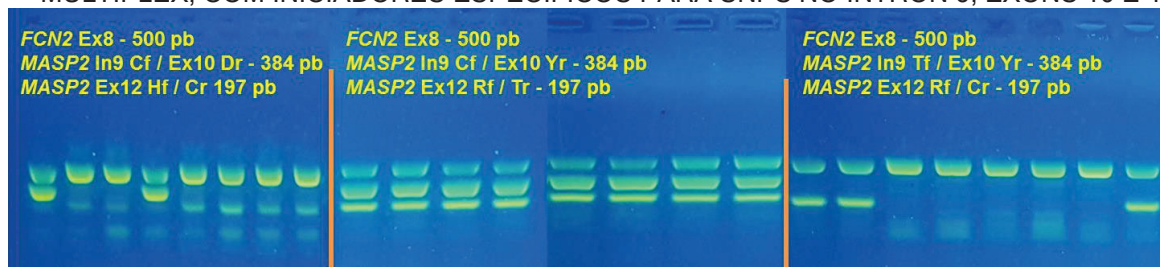
QUADRO 9. PROTOCOLO PARA A REAÇÃO DE PCR-SSP MULTIPLEX COM INICIADORES PARA OS SNPS DE 3'UTR DO GENE *CD59*.

<b>Reagentes</b>	<b>[Final]</b>	<b>Vol. (ml)</b>
Tampão (x)	1	1,00
Sol Q	0,1	0,20
dNTP (mM)	0,2	1,00
Iniciador genérico r	0,1	0,10
Iniciador genérico f	0,1	0,10
Iniciador <i>CD59</i> 3'UTR_Gf	0,3	0,30
Iniciador <i>CD59</i> 3'UTR_Af	0,3	0,30
Iniciador <i>CD59</i> 3'UTR_Ar	0,3	0,30
Iniciador <i>CD59</i> 3'UTR_Cr	0,3	0,30
Taq (U/ml)	0,04	0,08
DNA		1,00
H2O		5,32
Total		10,00

NOTA: f - iniciador direto; r - iniciador reverso

Por fim, os produtos de PCR foram aplicados em um gel de agarose a 1,2%, corado com Sybrsafe (Invitrogen) e submetidos à eletroforese. Após a corrida eletroforética, os fragmentos amplificados puderam ser visualizados sob luz azul, fotografados e analisados no computador (FIGURA 10).

FIGURA 10. IMAGEM DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DO GENE *MASP2* POR PCR-SSP MULTIPLEX, COM INICIADORES ESPECÍFICOS PARA SNPS NO INTRON 9, EXONS 10 E 12.



FONTE: O autor (2018).

NOTA: FCN2 Ex8 - controle endógeno; pb - pares de base; In - intron; Ex - exon.

### 3.2.4 Quantificação sorológica de MASP-2

Para investigar se os haplótipos de *MASP2* influenciam na expressão da proteína MASP-2 em pacientes com NIC 2 e 3, utilizamos os resultados da quantificação sérica de MASP-2, realizada em 2014 na Universidade de Aarhus (Dinamarca), por meio da técnica TRIFMA (Time-resolved Immunofluorimetric Assay), um método *in house* desenvolvido e patenteado pelo Departamento de Biomedicina da Universidade, chefiado pelo Prof. Jens C. Jensenius. TRIFMA é um ensaio imunofluorimétrico do tipo sanduíche, que envolve a leitura da radioatividade de longa duração de íons európio, medida pela contagem de fótons. É considerado um método com alta sensibilidade, reprodutibilidade e de grande alcance.

O Dr. Carlos Maestri (Serviço de Ginecologia e Mama do Hospital Erasto Gaertner) forneceu os resultados da quantificação de MASP-2 em amostras de soro de 85 mulheres com diagnóstico NIC 2 e 3, que são também participantes do nosso estudo. Os testes sorológicos foram realizados pela colega Hellen Weinschütz. Para essa análise incluímos também 134 mulheres do grupo de comparação I.

Para realizar a quantificação sérica de MASP-2, a proteína foi capturada através de um anticorpo monoclonal (5F5) específico para o domínio CCP1 de MASP-2. Em seguida, um anticorpo monoclonal específico para região C-terminal do domínio serina protease, foi adicionado à reação. Num primeiro momento, anticorpos monoclonais, diluídos em tampão fosfato-salino (PBS), foram adsorvidos em microplacas de 96 poços (Thermo Scientific™ Nunc FluoroNunc) durante 24 horas a temperatura ambiente. No dia seguinte, após o descarte do líquido, as placas foram bloqueadas com 200 µl de tampão salino Tris (TBS) contendo 1 mg/mL de albumina sérica humana (HSA), incubadas por 60min e lavadas 3 vezes com TBS/Tween.

Quatro amostras de soro, com concentrações já conhecidas de MASP-2, foram utilizadas como controle interno da reação. As amostras de soro do estudo foram então diluídas, bem como os controles internos e os soros para a curva padrão, em uma solução com alto teor salino (20 mM Tris, 1 M NaCl, 0.05% Triton X-100, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% HSA em pH 7.4). A diluição das amostras foi de 1:100 para o ensaio de MASP-2. A diluição de soro para a curva padrão foi feita a partir de 1:10 (1:10, 1:30 até 1:7290) e resultou em uma curva de oito pontos, representando

diferentes diluições. Todas as amostras do estudo, de controle e amostras para a curva, foram avaliadas em duplicatas para aumentar a confiabilidade dos resultados.

Após o preparo das placas, essas foram incubadas por 24 horas a 4°C e lavadas três vezes com TBS/Tween enriquecido com cálcio. Em seguida, foram incubadas com anticorpo anti-MASP-2, marcado com biotina e diluído em TBS/Tween/Ca<sup>++</sup> por duas horas. Em seguida, as placas foram lavadas novamente três vezes e, então, as amostras foram colocadas em contato com streptavidina marcada com európio (PerkinElmer 1244-360, 0,25mg/2,5mL), diluído em TBS/Tween/EDTA, por 60 min. Por fim, as placas foram lavadas e as reações finalizadas com tampão de aprimoramento “Enhancement” (Perkin Elmer), por 5 minutos em agitação.

A leitura e contagem final dos íons foi realizada por meio de fluorimetria em tempo resolvido (DELFIReader – Perkin Elmer). O cálculo das concentrações plasmáticas de MASP-2 foi realizado através de um fator multiplicador.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada uma análise descritiva dos dados sócio-demográficos das pacientes com NIC de alto grau e com câncer do colo do útero. As frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas de *MASP2* e *CD59* foram obtidas por contagem direta. As hipóteses de equilíbrio de Hardy-Weinberg e de diferenciação populacional foram avaliadas utilizando-se o teste de Guo e Thompson (2002) e o de Raymond e Rousset (ROUSSET; RAYMOND, 1995) e Goudet et al. (1996), respectivamente, no pacote de programas ARLEQUIN v.3.5.

As análises de associação foram realizadas, primeiramente, por meio do teste de Fisher bicaudal, por meio do programa Sisa Tables. Quando apropriado, foi calculado o *odds ratio*, com intervalo de confiança de 95%. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Em seguida, realizamos o teste de regressão logística binária para verificar se haveria associação entre as frequências alélicas e haplotípicas de *MASP2* e *CD59* e o diagnóstico das pacientes (NIC de alto grau e câncer cervical), corrigindo os valores para variáveis independentes. Para tal, verificamos se as variáveis independentes, como idade e ancestralidade, poderiam influenciar nas análises de comparação. Corrigimos os valores para as variáveis

associadas ao diagnóstico com valor de  $P \leq 0.25$ . Para essa análise de comparação, também testamos os efeitos dominante, recessivo e aditivo de SNPs e haplótipos.

A possibilidade de associação entre os haplótipos de *MASP2* e os fenótipos (concentrações séricas de MASP-2) entre as mulheres com NIC 2 e 3, foi testada através dos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, utilizando os programas STATA 9.0 (StataCorp, Texas, EUA) e Graphpad Prism 6 (Graphpad software, Prism 6 for MAC OS X).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE MULHERES COM NIC DE ALTO GRAU E COM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

Nesse estudo, foram incluídas 193 mulheres com diagnóstico NIC de alto grau e 114 mulheres com câncer cervical. As principais características levantadas dos grupos de pacientes com câncer cervical e com NIC de alto grau podem ser visualizadas na Tabela 1.

A idade das pacientes com NIC de alto grau variou entre 14 a 61 anos (idade média = 31,5) e das pacientes com câncer de 22 a 90 anos (idade média = 47). A idade considerada foi, prevalentemente, àquela apresentada no período em que foi realizado o diagnóstico. As mulheres foram agrupadas de acordo com a faixa etária: idade entre 14 e 20 anos, entre 21 e 40 anos, entre 41 e 60 anos e acima de 60 anos (GRÁFICO 1). Observamos que entre as mulheres com NIC de alto grau, 85,4% tinham idade entre 21 e 40 anos, enquanto que entre as mulheres com câncer cervical, 43,3% se encontraram nessa faixa etária e 52,9% tinham idade acima de 40 anos.

Em relação à cor de pele, entre as pacientes com NIC de alto grau, 76 (39,2%) eram brancas, 109 (56,2%) pardas e 8 (4,1%) negras. Entre as pacientes com câncer cervical, 58 (50,9%) eram brancas, 52 (45,6%) pardas e 4 (3,5%) negras (GRÁFICO 2). Quanto à ancestralidade, as mulheres foram classificadas em dois grupos, de acordo com a ancestralidade predominante: euro-brasileiras e afro-brasileiras. A maior parte das pacientes era euro-brasileira (~ 95%) (TABELA 1).

Foi realizada uma entrevista com as pacientes, incluindo perguntas relacionadas a hábitos que podem conferir maior risco para o desenvolvimento de câncer cervical. Os principais dados e informações levantadas estão resumidos na Tabela 1. Dados sobre o nível de escolaridade, hábito de fumar, idade na primeira relação sexual, histórico familiar de câncer, se realiza o exame Papanicolaou anualmente e multiparidade, podem ser visualizados nos Gráficos 3 a 7 e na Tabela 3.

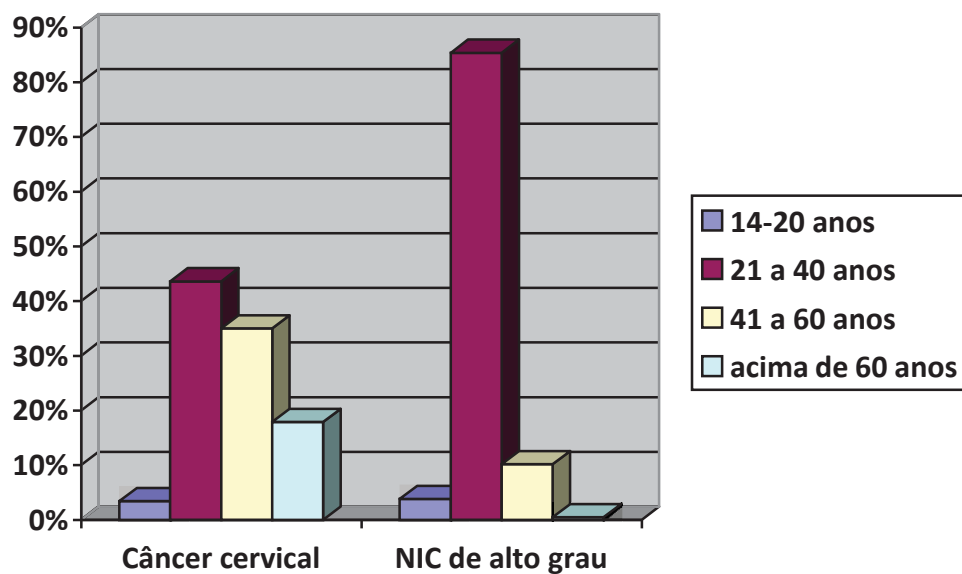
TABELA 1. CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE PACIENTES COM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO E COM NIC DE ALTO GRAU.

	GRUPOS			
	CC n=114	NIC 2 e 3 n=193	Valor de p	OR (IC 95%)
<b>Idade</b> (idade média)	22 a 90 (47)	14 a 61 (31,5)	<0,0001	n.a.
<b>Ancestralidade</b>				
Euro-brasileiros (%)	110 (96.49)	185 (95.85)	0,98	n.s.
Afro-brasileiros (%)	4 (3.51)	8 (4.15)		
<b>Anos de estudo</b>				
≤ 9 (%)	90 (78.95)	125 (64.77)	0,0011	2.03 (1.2-3.5)
>9 (%)	24 (21.05)	68 (35.23)		
<b>Hábito de fumar</b>				
Sim (%)	25 (21.93)	66 (34.20)	0,37	n.s.
Ex-fumante (%)	29 (25.44)	37 (19.17)		
Nunca (%)	60 (52.63)	90 (46.63)		
<b>Início da atividade sexual</b>				
(idade)				
<16 (%)	42 (36.84)	100 (51.82)		
16 - 20 (%)	58 (50.88)	85 (44.04)		
>20 (%)	14 (12.28)	8 (4.14)		
<b>Histórico familiar de câncer</b>				
Sim (%)	68 (77.2)	-	n.a.	n.a.
Não (%)	20 (22.8)	-	n.a.	n.a.
<b>Realiza o teste Papanicolaou anualmente</b>				
Sim (%)	47 (41.2)	-	n.a.	n.a.
Não (%)	67 (58.8)	-	n.a.	n.a.

FONTE: O autor (2018).

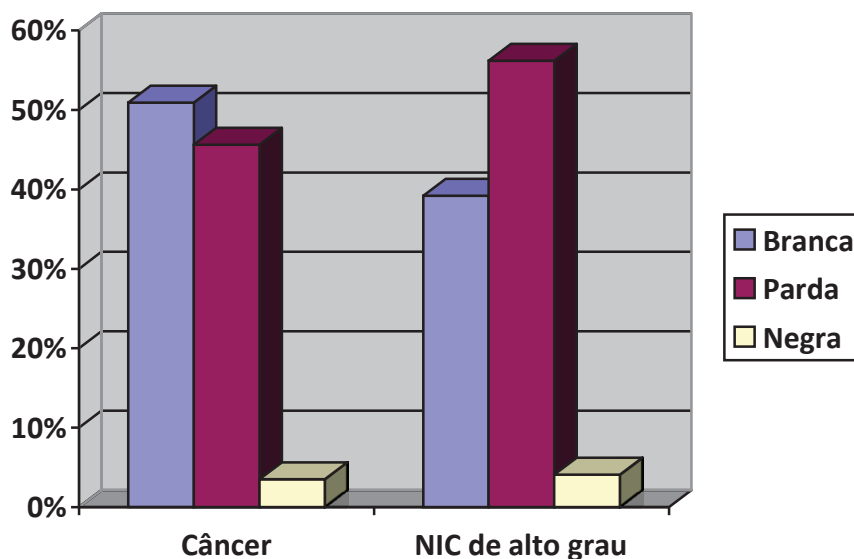
NOTA: CC: Câncer do colo do útero; NIC: neoplasia intraepitelial cervical; n.s.: não significativo; n.a.: não aplicável; - : sem dados.

GRÁFICO 1. DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES COM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO E COM NIC DE ALTO GRAU POR FAIXA ETÁRIA.



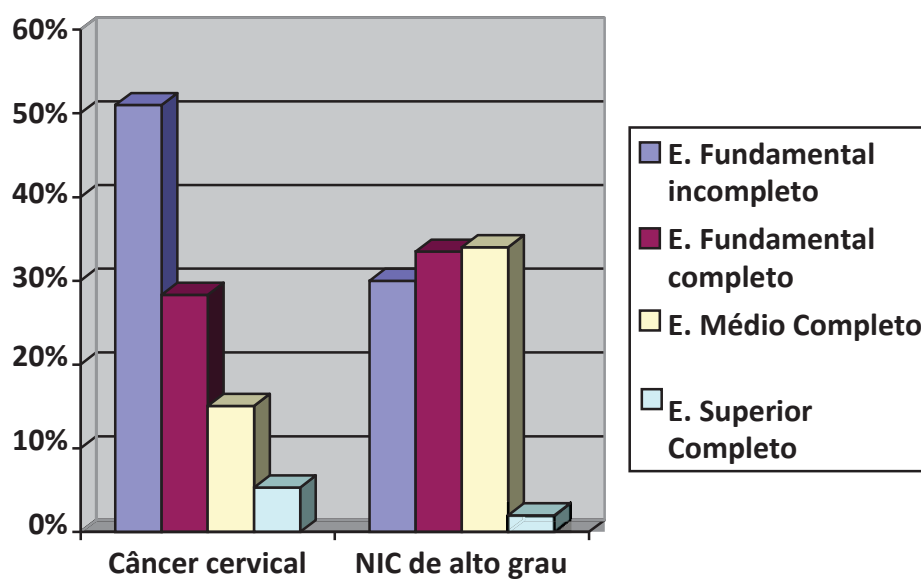
FONTE: O autor (2018)

GRÁFICO 2. DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES COM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO E COM NIC DE ALTO GRAU POR COR DE PELE.



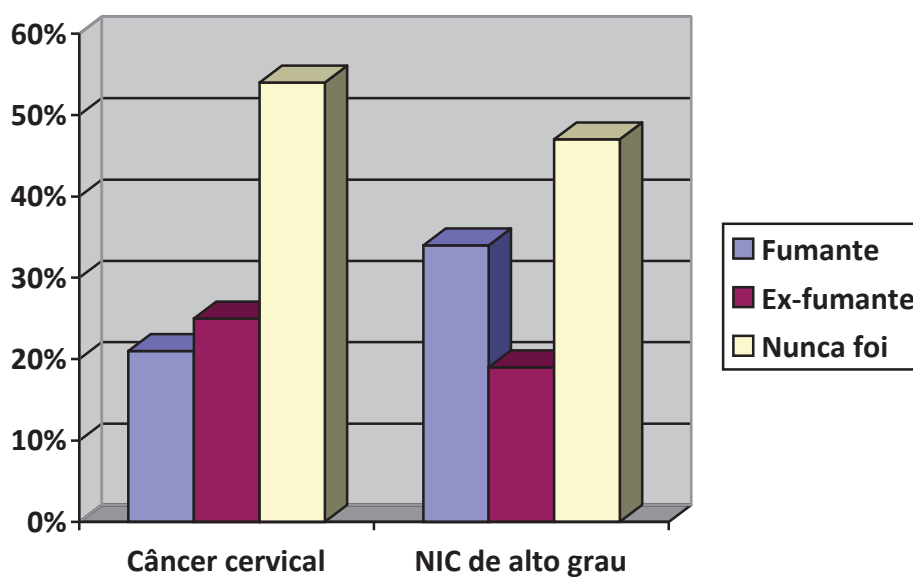
FONTE: O autor (2018)

GRÁFICO 3. NÍVEL DE ESCOLARIDADE DAS PACIENTES COM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO E COM NIC DE ALTO GRAU.



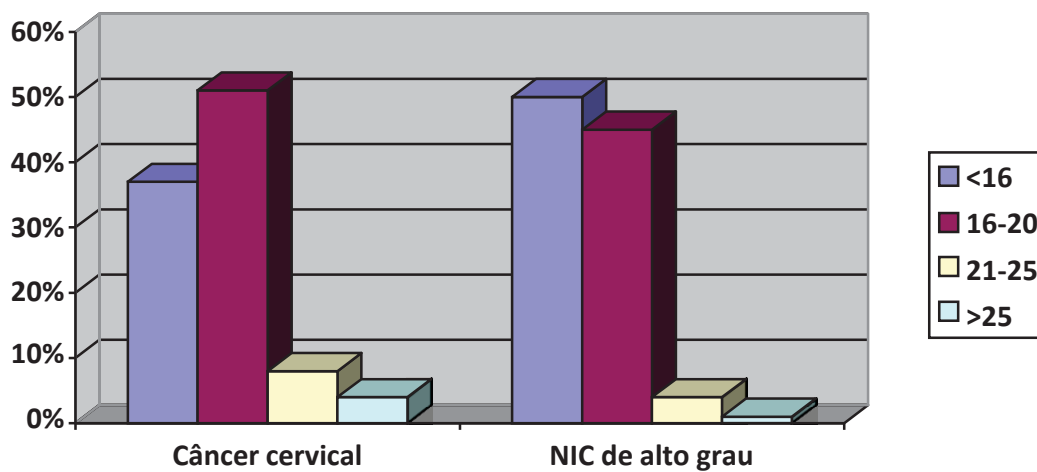
FONTE: O autor (2018)

GRÁFICO 4. HÁBITO DE FUMAR ENTRE AS PACIENTES COM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO E COM NIC DE ALTO GRAU.



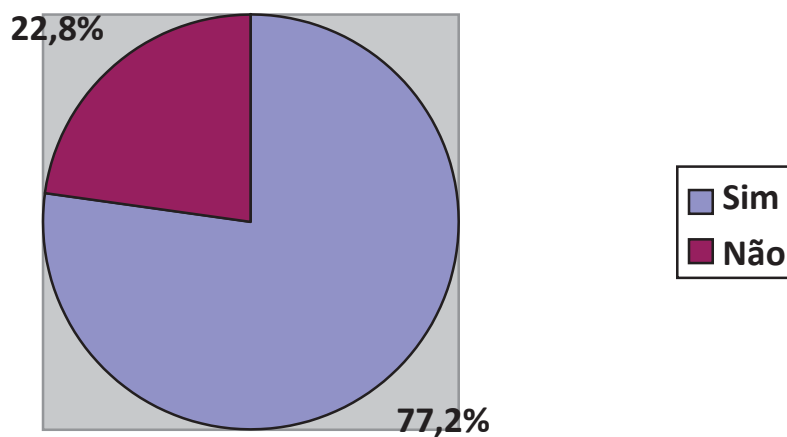
FONTE: O autor (2018)

GRÁFICO 5. IDADE NA PRIMEIRA RELAÇÃO SEXUAL DAS PACIENTES COM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO E COM NIC DE ALTO GRAU.



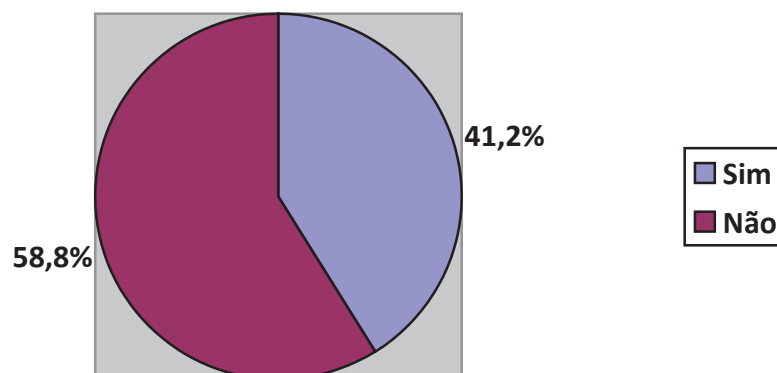
FONTE: O autor (2018)

GRÁFICO 6. HISTÓRICO FAMILIAR DE CÂNCER ENTRE AS PACIENTES COM CÂNCER CERVICAL.



FONTE: O autor (2018)

GRÁFICO 7. REALIZAÇÃO ANUAL DO EXAME PREVENTIVO PAPANICOLAOU PELAS MULHERES COM CÂNCER CERVICAL ANTES DO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA.



FONTE: O autor (2018)

TABELA 2. NÚMERO DE GESTAÇÕES DAS PACIENTES COM CÂNCER CERVICAL E COM NIC DE ALTO GRAU.

<i>Nº de gestações</i>	<i>NIC de alto grau</i>	<i>Câncer cervical</i>
0	23 (11,2%)	3 (2,5%)
1	54 (26,2%)	20 (17%)
2	62 (30,1%)	26 (22%)
3	40 (19,42%)	23 (19,5%)
4	21 (10,2%)	18 (15,3%)
>4	6 (2,9%)	28 (23,7%)

FONTE: O autor (2018)

### 4.3 RESULTADOS DA ANÁLISE DOS SNPS NO GENE *MASP2*

#### 4.3.1 Determinação das frequências alélicas e haplotípicas de *MASP2*

As frequências alélicas dos SNPs *rs2273344* e *rs9430347*, localizados nos introns 4 e 5 de *MASP2*, foram determinados em 85 pacientes com câncer do colo do útero, 123 pacientes com NIC de alto grau e 190 mulheres do grupo de comparação. As frequências dos SNPs *rs2273346*, *rs12085877* e *rs178245*, localizados no intron 9 e nos exons 10 e 12 de *MASP2*, foram determinados em 113 pacientes com câncer cervical, 133 pacientes com NIC de alto grau e em 190 mulheres do grupo de comparação. As frequências dos SNPs no gene *MASP2* podem ser visualizadas na Tabela 3.

TABELA 3. FREQUÊNCIAS DOS SNPS NO GENE *MASP2*.

<b>SNP</b>	<b>Região</b>	<b>NIC de alto grau</b>	<b>Câncer cervical</b>	<b>Grupo de comparação</b>
<i>rs2273344</i> *G	Intron 4	0,14	0,20	0,19
<i>rs9430347</i> *A	Intron 5	0,14	0,20	0,19
<i>rs17409276</i> *T	Intron 9	0,13	0,15	0,15
<i>rs12711521</i> *T	Exon 10	0,23	0,27	0,26
<i>rs2273346</i> *C	Exon 10	0,03	0,04	0,04
<i>rs12085877</i> *A	Exon 12	<0,01	0,00	<0,01
<i>rs1782455</i> *C	Exon 12	0,19	0,22	0,20

FONTE: O autor (2018)

As frequências haplotípicas foram avaliadas em duas análises. Na primeira, foram incluídos os sete SNPs investigados no gene *MASP2* e determinadas as frequências de dez haplótipos. Na segunda análise, foram incluídos apenas os SNPs localizados no intron 9 e nos exons 10 e 12 e foram determinadas as frequências de

sete haplótipos. Para a segunda análise, foi possível incluir um número maior de pacientes.

As frequências haplotípicas das duas análises podem ser visualizadas nas Tabelas 4 e 5. Os haplótipos mais comuns foram *AGCYVRT* (primeira análise) e *CYVRT* (segunda análise) nos três grupos do estudo, seguido de *GATDVRC* (primeira análise) e *TDVRC* (segunda análise), também nos três grupos.

O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar as frequências alélicas e haplotípicas de *MASP2* entre os grupos. Não houve diferença significativa entre eles.

TABELA 4. FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS DE *MASP2*, INCLUINDO TODOS OS SNPS AVALIADOS.

<b>Haplótipo</b>	<b>NIC de alto grau</b>	<b>Câncer</b>	<b>Grupo de comparação</b>
<i>AGCYVRT</i>	0,74	0,71	0,70
<i>GACYVRT</i>	0,02	0,01	0,04
<i>GATDVRC</i>	0,10	0,13	0,14
<i>AGCDART</i>	0,03	0,03	0,04
<i>AGCDVRC</i>	0,05	0,03	0,04
<i>GACDVRC</i>	<0,01	0,04	0,01
<i>AGTDVRC</i>	0,01	0,01	<0,01

FONTE: O autor (2018)

TABELA 5. FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS DE *MASP2*, INCLUINDO OS SNPS NO INTRON 9 E NOS EXONS 9 E 12.

<b>Haplótipo</b>	<b>NIC de alto grau</b>	<b>Câncer</b>	<b>Grupo de comparação</b>
<i>CYVRT</i>	0,76	0,72	0,73
<i>TDVRC</i>	0,13	0,15	0,14
<i>CDART</i>	0,03	0,04	0,04
<i>CDVRC</i>	0,05	0,06	0,05
<i>CDVRT</i>	0,01	0,01	0,01

FONTE: O autor (2018)

#### 4.3.2 Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg

As frequências dos SNPs de *MASP2* foram avaliadas se estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos três grupos do estudo: pacientes com câncer cervical (TABELA 6), NIC de alto grau (TABELA 7) e grupo de comparação (TABELA 8). Todas as frequências haplotípicas estavam em equilíbrio, apenas o haplótipo menos comum estava em desequilíbrio entre as mulheres do grupo de comparação.

TABELA 6. RESULTADOS DO TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG DAS FREQUÊNCIAS DOS SNPS NO GENE *MASP2* ENTRE AS PACIENTES COM CÂNCER CERVICAL.

<b>SNP</b>	<b>Het. Obs.</b>	<b>Het. Esp.</b>	<b>Valor de P</b>	<b>d.p.</b>
<i>rs2273344</i>	0,27	0,33	0,10	0,00
<i>rs9430347</i>	0,26	0,32	0,09	0,00
<i>rs17409276</i>	0,27	0,26	1,00	0,00
<i>rs12711521</i>	0,35	0,39	0,24	0,00
<i>rs2273346</i>	0,08	0,07	1,00	0,00
<i>rs12085877</i>	-	-	-	-
<i>rs1782455</i>	0,28	0,34	0,06	0,00

FONTE: O autor (2018)

NOTA: Het. Obs.- Taxa de Heterozigose Observada; Het. Esp. - Taxa de Heterozigose Esperada; d.p. - desvio padrão.

TABELA 7. RESULTADOS DO TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG DAS FREQUÊNCIAS DOS SNPS NO GENE *MASP2* ENTRE AS PACIENTES COM NIC DE ALTO GRAU.

<b>SNP</b>	<b>Het. Obs.</b>	<b>Het. Esp.</b>	<b>Valor de P</b>	<b>d.p.</b>
<i>rs2273344</i>	0,20	0,24	0,07	0,00
<i>rs9430347</i>	0,20	0,24	0,07	0,00
<i>rs17409276</i>	0,24	0,23	1,00	0,00
<i>rs12711521</i>	0,37	0,36	1,00	0,00
<i>rs2273346</i>	0,06	0,06	1,00	0,00
<i>rs12085877</i>	<0,01	<0,01	1,00	0,00
<i>rs1782455</i>	0,29	0,31	0,57	0,00

FONTE: O autor (2018)

NOTA: Het. Obs. - Taxa de Heterozigose Observada; Het. Esp. - Taxa de Heterozigose Esperada; d.p. - desvio padrão

TABELA 8. RESULTADOS DO TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG DAS FREQUÊNCIAS DOS SNPs NO GENE *MASP2* ENTRE AS MULHERES DO GRUPO DE COMPARAÇÃO.

<b>SNP</b>	<b>Het. Obs.</b>	<b>Het. Esp.</b>	<b>Valor de P</b>	<b>d.p.</b>
<i>rs2273344</i>	0,28	0,31	0,24	0,00
<i>rs9430347</i>	0,28	0,31	0,24	0,00
<i>rs17409276</i>	0,24	0,25	0,56	<0,01
<i>rs12711521</i>	0,34	0,39	0,09	<0,01
<i>rs2273346</i>	0,09	0,09	1,00	0,00
<i>rs12085877</i>	<0,01	0,01	<0,01	0,00
<i>rs1782455</i>	0,31	0,33	0,38	<0,01

FONTE: O autor (2018)

NOTA: Het. Obs. - Taxa de Heterozigose Observada; Het. Esp. - Taxa de Heterozigose Esperada; d.p. - desvio padrão

#### 4.3.4 Teste de diferenciação populacional

O teste exato de diferenciação populacional foi realizado para verificar se a distribuição das frequências dos SNPs de *MASP2* difere entre as pacientes com NIC de alto grau, câncer cervical, e as mulheres do grupo de comparação. Não houve diferença entre os três grupos.

#### 4.3.5 Teste de regressão logística binária

O teste de regressão logística binária foi realizado para verificar se haveria associação entre as frequências alélicas e haplotípicas de *MASP2* e o diagnóstico das pacientes (NIC de alto grau e câncer cervical), corrigindo os valores para as variáveis independentes idade e ancestralidade, que foram associadas com o diagnóstico das pacientes na análise univariável (valor de  $P \leq 0.25$ ). Testamos os efeitos dominante, recessivo e aditivo de cada SNP nessa análise. Os resultados, no entanto, indicaram que mesmo após correção, não houve associação entre os SNPs investigados e os haplótipos mais comuns (*AGCYVRT*, *CYVRT* e *TDVRC*) de *MASP2* e a doença.

#### 4.3.6 Comparação entre haplótipos de *MASP2* e concentrações de MASP-2

As concentrações séricas da proteína MASP-2 foram quantificadas em 84 mulheres com NIC de alto grau e em 134 mulheres do grupo de comparação, pela técnica TRIFMA, na Universidade de Aarhus (DK). Investigamos se haveria associação entre as concentrações de MASP-2 e NIC de alto grau. Porém, observamos que não houve associação.

Ainda mais, verificamos que entre as mulheres com NIC de alto grau, os haplótipos de *MASP2* não estavam associados com as concentrações de MASP-2.

### 4.4 RESULTADOS DA ANÁLISE DOS SNPS NO GENE *CD59*

#### 4.4.1 Frequências alélicas e haplotípicas de *CD59*

Nesse estudo, foram haplotipados quatro SNPs de *CD59*, localizados no intron 3 (*rs861256 A>G* e *rs831625 C>G*) e na região não traduzida 3' (*rs1047581 A>G* e *rs704697 A>G*) em 95 pacientes com câncer do colo do útero, 135 pacientes com NIC de alto grau e 138 mulheres de um grupo de comparação. As frequências alélicas podem ser visualizadas na Tabela 9 e as frequências haplotípicas, na Tabela 10.

TABELA 9. FREQUÊNCIAS DOS SNPS NO GENE *CD59*.

<b>SNP</b>	<b>NIC de alto grau</b>	<b>Câncer</b>	<b>Grupo de comparação</b>
<i>rs861256*G</i>	0,43	0,56	0,36
<i>rs831625*G</i>	0,41	0,56	0,34
<i>rs1047581*G</i>	0,30	0,19	0,31
<i>rs704697*G</i>	0,47	0,39	0,60

FONTE: O autor (2018)

TABELA 10. FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS DE *CD59*, FORMADOS PELOS SNPS *rs861256 A>G*, *rs831625 C>G*, *rs1047581 A>G* e *rs704697 A>G*.

<i>Haplótipo</i>	<i>NIC de alto grau</i>	<i>Câncer</i>	<i>Grupo de comparação</i>
ACAA	0,06	0,03	0,03
GCAA	<0,01	0,01	0,14
ACAG	0,21	0,19	0,26
ACGG	0,28	0,19	0,05
GGAA	0,40	0,55	0,31
GGAG	0,01	<0,01	<0,01
AGAA	<0,01	0,01	<0,01
GCGG	<0,01	-	<0,01
-	<0,01	-	<0,01
GCAA	-	-	0,03
ACGG	-	-	0,30
AGAG	-	-	0,01
GCAG	-	-	0,01

FONTE: O autor (2018)

Por meio do teste de Fisher e *Odds Ratio*, comparamos as frequências alélicas entre os grupos de mulheres com a doença (NIC de alto grau e câncer do colo do útero) e o grupo de comparação (TABELA 11). Entre o grupo de mulheres com câncer do colo do útero e o de comparação, a diferença foi significativa para os quatro SNPs, sendo que *rs861256\*G* e *rs831625\*G* foram associados com susceptibilidade para a doença e *rs1047581\*G* e *rs704697\*G* com proteção contra a doença. A diferença entre os grupos de mulheres com NIC de alto grau e o de comparação foi significativa para três SNPs, sendo que *rs861256\*G* e *rs831625\*G* conferiram susceptibilidade para a doença e *rs704697\*G* proteção.

O haplótipo mais comum foi o GGAA, formado pelos alelos *rs861256\*G*, *rs831625\*G*, *rs1047581\*A* e *rs704697\*A*. Comparamos os grupos de mulheres com a doença (NIC de alto grau e com câncer do colo do útero) e o grupo de comparação em relação à GGAA, e analisamos se haveria diferença entre os grupos, testando o efeito dominante (homozigotos GGAA + heterozigotos *versus* homozigotos não-GGAA), o efeito aditivo (homozigotos *versus* heterozigotos *versus* homozigotos não-GGAA) e o efeito recessivo do haplótipo (homozigotos GGAA *versus* heterozigotos + homozigotos não-GGAA).

TABELA 11. ASSOCIAÇÃO ENTRE OS SNPS DE *CD59* E AS DOENÇAS NIC DE ALTO GRAU E CÂNCER DO COLO DO ÚTERO.

<b>SNP</b>	<b>NIC 2 e 3 vs. Grupo de comparação</b>		<b>Câncer vs. Grupo de comparação</b>	
	<b>OR (IC)</b>	<b>Valor de P</b>	<b>OR (IC)</b>	<b>Valor de P</b>
<i>rs861256</i> *G	1,38 (0,98-1,95)	0,027	2,07 (1,43-3,00)	<0,001
<i>rs831625</i> *G	1,50 (1,06-2,12)	0,005	2,56 (1,75-3,73)	<0,001
<i>rs1047581</i> *G	0,87 (0,61-1,26)	0,360	0,54 (0,35-0,84)	0,006
<i>rs704697</i> *G	0,64 (0,45-0,90)	0,003	0,42 (0,28-0,60)	<0,001

FONTE: O autor (2018)

NOTA: A análise de associação foi realizada por meio do teste de Fisher.

A diferença foi significativa entre o grupo de mulheres com câncer cervical e de comparação para os três efeitos de GGAA. Entre o grupo com NIC de alto grau e de comparação, a diferença foi significativa para o efeito dominante e aditivo de GGAA. Observamos que mulheres homozigotas GGAA são aproximadamente duas a três vezes mais predispostas ao câncer do colo do útero que portadoras de outros haplótipos (TABELA 12).

TABELA 12. ASSOCIAÇÃO ENTRE O HAPLÓTIPO GGAA DE *CD59* E AS DOENÇAS NIC DE ALTO GRAU E CÂNCER DO COLO DO ÚTERO.

<b>Haplótipo</b>	<b>NIC vs. Comparação</b>		<b>Câncer vs. comparação</b>	
	<b>OR (IC)</b>	<b>P</b>	<b>OR (IC)</b>	<b>P</b>
GGAA dom	1,79 (1,10-2,93)	0,019	2,67 (1,50-4,83)	0,001
GGAA rec	1,69 (0,76-3,72)	0,190	5,20 (2,45-11,04)	<0,001
GGAA adit	1,58 (1,00-2,31)	0,016	2,58 (1,72-3,88)	<0,001

FONTE: O autor (2018)

NOTA: A análise de associação foi realizada por meio do teste de Fisher.

#### 4.4.4 Teste de regressão logística binária

Verificamos na análise univariada, que as variáveis idade e ancestralidade poderiam influenciar na análise de associação entre os SNPs e o haplótipo GGAA de *CD59* com a doença (NIC de alto grau ou câncer cervical). Após correção dos

valores para essas variáveis, a diferença em relação aos SNPs e o haplótipo GGAA entre o grupo de mulheres com NIC de alto grau e o grupo de comparação deixou de ser significativa. Câncer do colo do útero, por outro lado, continuou fortemente associado com os quatro SNPs e o haplótipo GGAA (TABELA 13). Assim como na análise anterior (TABELA 12), observamos que mulheres homozigotas GGAA são aproximadamente duas a três vezes mais suscetíveis ao câncer do colo do útero que portadoras de outros haplótipos (TABELA 13).

TABELA 13. ASSOCIAÇÃO ENTRE OS SNPS E O HAPLÓTIPO GGAA DE CD59 E CÂNCER DO COLO DO ÚTERO.

<i>SNP/Haplótipo de CD59</i>	<i>Odds Ratio</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>Valor de P</i>
<i>rs861256</i> dominante	1,97	1,06 - 3,65	0,0300
<i>rs861256</i> recessivo	4,35	2,14 - 8,84	<0,001
<i>rs861256</i> aditivo	2,19	1,45 - 3,30	<0,001
<i>rs831625</i> dominante	2,82	1,54 - 5,16	0,001
<i>rs831625</i> recessivo	4,48	2,25 - 8,93	<0,001
<i>rs831625</i> aditivo	2,48	1,67 - 3,69	<0,001
<i>rs1047581</i> dominante	0,51	0,29 - 0,88	0,017
<i>rs1047581</i> recessivo	0,21	0,04 - 0,96	0,045
<i>rs1047581</i> aditivo	0,51	0,32 - 0,82	0,006
<i>rs704697</i> dominante	0,23	0,12 - 0,44	<0,001
<i>rs704697</i> recessivo	0,45	0,24 - 0,85	0,014
<i>rs704697</i> aditivo	0,43	0,28 - 0,64	<0,001
GGAA dominante	3,00	1,55 - 5,81	0,001
GGAA recessive	7,32	2,78 - 19,29	<0,001
GGAA aditivo	2,89	1,80 - 4,64	<0,001

FONTE: O autor (2018)

NOTA: A análise de associação foi realizada por meio do teste de regressão logística binária, corrigindo os valores para idade e ancestralidade.

#### 4.4.2 Teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg

As frequências haplotípicas dos três grupos do estudo foram testadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. A distribuição dos haplótipos estava em equilíbrio em todos os grupos (TABELAS 14, 15 e 16).

TABELA 14. TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG DAS FREQUÊNCIAS DOS SNPS NO GENE *CD59* NO GRUPO DE PACIENTES COM CÂNCER CERVICAL.

<b>SNP</b>	<b>Het. Obs.</b>	<b>Het. Esp.</b>	<b>Valor de P</b>	<b>d.p.</b>
<i>rs861256</i>	0,47	0,49	0,68	<0,01
<i>rs831625</i>	0,44	0,49	0,40	<0,01
<i>rs1047581</i>	0,34	0,31	0,50	<0,01
<i>rs704697</i>	0,42	0,48	0,28	<0,01

FONTE: O autor (2018)

NOTA: Het. Obs. - Taxa de Heterozigose Observada; Het. Esp. - Taxa de Heterozigose Esperada; d.p. - desvio padrão.

TABELA 15. TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG DAS FREQUÊNCIAS DOS SNPS NO GENE *CD59* NO GRUPO DE PACIENTES COM NIC DE ALTO GRAU.

<b>SNP</b>	<b>Het. Obs.</b>	<b>Het. Esp.</b>	<b>Valor de P</b>	<b>d.p.</b>
<i>rs861256</i>	0,55	0,49	0,22	<0,01
<i>rs831625</i>	0,51	0,49	0,60	<0,01
<i>rs1047581</i>	0,40	0,42	0,54	<0,01
<i>rs704697</i>	0,58	0,50	0,06	<0,01

FONTE: O autor (2018)

NOTA: Het. Obs. - Taxa de Heterozigose Observada; Het. Esp. - Taxa de Heterozigose Esperada; d.p. - desvio padrão

TABELA 16. TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG DAS FREQUÊNCIAS DOS SNPS NO GENE *CD59* NO GRUPO DE COMPARAÇÃO.

<b>SNP</b>	<b>Het. Obs.</b>	<b>Het. Esp.</b>	<b>Valor de P</b>	<b>d.p.</b>
<i>rs861256</i>	0,52	0,46	0,20	<0,01
<i>rs831625</i>	0,43	0,45	0,70	<0,01
<i>rs1047581</i>	0,43	0,43	1,00	<0,01
<i>rs704697</i>	0,50	0,48	0,60	<0,01

FONTE: O autor (2018)

NOTA: Het. Obs. - Taxa de Heterozigose Observada; Het. Esp. - Taxa de Heterozigose Esperada; d.p. - desvio padrão

#### 4.4.3 Teste de diferenciação populacional

O teste exato de diferenciação populacional foi aplicado para verificar se haveriam diferenças na distribuição das frequências haplotípicas de *CD59* entre as pacientes com câncer cervical, com NIC de alto grau e as mulheres do grupo de comparação. A diferença entre os grupos foi significativa, sendo que foi maior entre o grupo de comparação e o grupo de pacientes com câncer cervical (TABELA 17).

TABELA 17. RESULTADOS DO TESTE DE DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL COM AS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DO GENE *CD59*.

	<i>Pacientes com câncer</i>	<i>Pacientes com NIC de alto grau</i>
Pacientes com NIC de alto grau	0,022	
Grupo de comparação	<0,001	0,034

FONTE: O autor (2018)

## 5 DISCUSSÃO

O câncer do colo do útero é um tipo de câncer causado, principalmente, pela infecção persistente do vírus HPV no colo do útero. A evolução da infecção até a manifestação do câncer pode levar de 10 a 20 anos em mulheres com uma resposta imunológica normal (WHO, 2016). Durante esse período, surgem lesões pré-cancerosas, cujas células ainda não apresentam características de células malignas e que podem ser eliminadas sem tratamento. Ainda não se sabe ao certo porque em apenas uma parte das mulheres as lesões precursoras evoluem para câncer. Acredita-se que a resposta imune tem um papel determinante nesse processo (VAN DE WALL; NIJMAN; DAEMEN, 2014). Devido a esse fato, percebemos a importância de investigar genes do sistema imunológico, que poderiam esclarecer os mecanismos envolvidos e levar a identificação de novos marcadores de susceptibilidade para esse tipo de câncer.

### 5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS GRUPOS AMOSTRAIS DO ESTUDO

Entre as mulheres infectadas por HPV, apenas ~10% evoluem para câncer cervical. Na tentativa de descobrir fatores imunológicos, que poderiam esclarecer esse fato, optamos por incluir mulheres com NIC 2, NIC 3 e com câncer cervical. Pelo fato de tanto NIC 2 como NIC 3 serem considerados de alto grau, decidimos incluir as mulheres com esse diagnóstico em um mesmo grupo (WHO, 2016).

Incluimos dois grupos de comparação. Nomeamos esses grupos como grupos de comparação, porque não foi possível verificar se as participantes, em algum momento da vida, apresentaram câncer cervical ou citologia cervical alterada, o que seria importante para considerá-los como grupos de controle. Contudo, as mulheres dos dois grupos foram consideradas saudáveis, porque eram doadoras de sangue, acompanhantes de pacientes ou estavam trabalhando em um hospital, no momento da coleta.

Uma das características levantadas no estudo foi a idade das pacientes. De acordo com os dados coletados, 85,4% das mulheres com NIC de alto grau (NIC 2 e 3) tinham entre 21 a 40 anos, enquanto que entre as mulheres com câncer cervical, apenas 43,6% se encontravam nessa faixa etária e 52,9% tinham idade acima de 40

anos. Considerando a evolução normal da doença, de 10 a 20 anos, essa diferença entre os dois grupos era esperada.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 85% dos óbitos por câncer cervical ocorrem em países em desenvolvimento (WHO, 2016). Isso poderia ser consequência, principalmente, da falta de programas de rastreamento efetivos nesses países (WHO, 2016). Porém, é possível que esse fato também esteja relacionado com a carência de informações na população. Sabemos que o Brasil é um país em desenvolvimento, porém, com um programa de rastreamento bem estabelecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Apesar disso, percebemos que menos da metade das mulheres realizam o exame preventivo Papanicolaou anualmente. É possível que ainda exista pouco acesso a informações, ou, até mesmo, dificuldade de acesso a instituições de saúde que oferecem esse serviço.

A baixa escolaridade é um fator de risco que pode dificultar o acesso a informações. De acordo com uma revisão sistemática, realizada por Martins et al. (2011), a não realização do exame Papanicolaou e, por conseguinte, o não tratamento de lesões pré-cancerosas, está associado com a baixa escolaridade e à baixa ou alta idade das pacientes, bem como, com o baixo nível socioeconômico. Nesse estudo, verificamos que, entre as mulheres com câncer cervical, mais de 50% não completaram o Ensino Fundamental e apenas ~20% completaram o Ensino Médio. Acreditamos que ainda existe um déficit de acesso a informações e orientações adequadas e que, uma vez corrigido, poderia aumentar o acesso de mulheres ao programa de rastreamento no país. Sabe-se que o tratamento precoce pode curar até 80% dos casos de câncer cervical (WHO, 2016).

A transmissão do vírus HPV ocorre através do contato sexual. Portanto, o comportamento sexual das mulheres pode influenciar no desenvolvimento de câncer do colo uterino. De acordo com a OMS e do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o início precoce da atividade sexual é um importante fator de risco (INCA, 2018; WHO, 2016). Nesse estudo, não foi possível comparar a idade da primeira relação sexual entre as mulheres com a doença e o grupo de comparação. Porém, foi possível observar que 50,5% das mulheres com NIC de alto grau e 36,8% das mulheres com câncer cervical tiveram o primeiro contato sexual ainda antes de completarem 16 anos. Até completarem 20 anos, 95,1% das mulheres com NIC e 87,8% das mulheres com câncer cervical já haviam iniciado a atividade sexual.

A multiparidade também é considerada um fator de risco (DOS ANJOS et al., 2009). Observamos que entre as pacientes com NIC de alto grau, apenas 13,1% tiveram 4 ou mais gestações, enquanto que entre as pacientes com câncer, o número de mulheres com esse número de gestações foi de 39%. Isso pode estar relacionado com a própria idade das pacientes com câncer cervical. , porém corrobora os resultados de estudos anteriores e é um indicador de risco importante, que deve ser considerado no acompanhamento de mulheres múltiparas.

## 5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS SNPS DE *MASP2* E CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

De acordo com estudos anteriores, *MASP-2* apresenta um papel duplo no desenvolvimento de câncer. Por um lado, concentrações elevadas da proteína foram associadas a um pior prognóstico em pacientes com câncer colorretal (YTTING et al., 2005) e com carcinoma de células escamosas do esôfago (VERMA et al., 2006). Em mulheres com câncer do ovário, a expressão de mRNA *MASP2* estava aumentada. Além disso, observou-se em crianças com tumores no sistema nervoso central, com linfoma não-Hodgkin e com leucemia linfoblástica aguda, e em pacientes com carcinoma papilar da tireóide, que as concentrações de *MASP-2* também estavam elevadas (FISCH et al., 2011; SHI et al., 2013). Por outro lado, a expressão de *MASP-2* foi descrita como um marcador favorável para câncer do fígado, sendo que, concentrações baixas da proteína conferiram menor sobrevida para os pacientes (UHLEN et al., 2015).

Sabe-se que a proteína *MASP-2* desempenha um papel importante na ativação da via das lectinas do SC. A ativação exacerbada do SC pode favorecer o crescimento tumoral. Por outro lado, a deficiência da resposta imune pode contribuir para sobrevivência das células malignas (COLLOTA et al., 2009; QIAN; POLLARD, 2010). Dessa forma, é possível pressupor, que a expressão aumentada de *MASP-2* tanto pode favorecer a eliminação de células cancerosas, como também pode propiciar um microambiente tumoral favorável para a progressão do câncer. Entretanto, a forma como *MASP-2* influencia na tumorigênese, ainda não está bem esclarecida. Além disso, mais estudos são necessários para investigar se o aumento da expressão dessa proteína em pacientes com câncer é modulado pela própria

doença ou se poderia ocorrer devido a polimorfismos genéticos, associados à expressão de MASP-2.

Nesse estudo, nosso objetivo foi verificar se polimorfismos genéticos, que modulam a expressão da proteína MASP-2, poderiam aumentar a propensão para o desenvolvimento de câncer cervical. Para tal, incluímos sete SNPs, entre os quais 5 foram anteriormente associados com concentrações elevadas de MASP-2, e 2 com concentrações baixas da proteína. Os alelos *g.7164G* (intron 4) e *g.7441A* (intron 5), que flanqueiam o exon alternativo 5 (único para MAp19), foram associados a concentrações elevadas de MASP-2 e baixas de MAp19. A variante *g.21081T* localizada no intron 9 e *g.21370T* no exon 10, também aumentaram a concentração de MASP-2 e diminuíram a concentração de MAp19. Já as variantes *g.21389T>C* (exon 10) e *g.24599G>A* (exon 12) foram associadas a concentrações baixas de MASP-2, enquanto que *g.24762T>C* do exon 12 com concentrações elevadas. Os exons 10 e 12 codificam os últimos domínios da proteína MASP-2, que se ligam ao substrato (C2 ou C4) ou a outro zimógeno de MASP-2 ou MASP-1, e, portanto, uma substituição de aminoácido nesses domínios pode prejudicar a função da proteína e diminuir a ativação do SC.

De acordo com os nossos resultados, não houve associação entre os SNPs e haplótipos de *MASP2* investigados e NIC de alto grau ou câncer do colo do útero. O haplótipo *TDVRC*, associado anteriormente com concentrações elevadas de MASP-2, também não aumentou a susceptibilidade para a doença. Apesar disso, sugerimos que esse haplótipo e outros SNPs, associados com expressão aumentada da proteína, sejam analisados em pacientes com outros tipos de câncer.

Entre as mulheres com NIC de alto grau, não houve associação entre os haplótipos de *MASP2* e as concentrações séricas de MASP-2. Acreditamos que a expressão de MASP-2 nessas pacientes poderia estar sendo modulada pela própria doença e não pelos polimorfismos do gene.

É importante destacar ainda que este é o primeiro estudo envolvendo SNPs no gene *MASP2* e câncer do colo do útero. Portanto, acreditamos que mais estudos são necessários para confirmar esses resultados. Sugerimos que outros SNPs de *MASP2*, também associados com alterações na expressão da proteína, sejam incluídos em estudos posteriores.

### 5.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS SNPS DE *CD59* E CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

A proteína CD59 é um importante regulador do SC, com importante papel na inibição da formação do MAC na superfície celular (NINOMIYA; SIMS, 1992). Portanto, pode impedir a lise celular mediada pelo MAC, independente da via pela qual o SC é ativado. CD59 tem um papel importante na proteção de células autólogas e restringe a ação do SC a um alvo específico.

Interessantemente, concentrações elevadas dessa proteína foram observadas na superfície de diversos tipos de células malignas, o que poderia ser um mecanismo de escape desenvolvido pelas mesmas para evitar a ação lítica do SC. Entretanto, se, por um lado, a própria doença poderia influenciar na expressão da proteína, por outro lado, é possível que variações genéticas no gene *CD59* poderiam ser responsáveis pela expressão elevada de CD59 tanto em células normais como em células malignas de um indivíduo. Já foram realizados vários estudos funcionais envolvendo CD59 e câncer, que analisaram a expressão da proteína na superfície das células tumorais (OYANG et al., 2016; KESSELRING et al., 2014). Porém, ainda não existem estudos de associação envolvendo polimorfismos no gene *CD59* e câncer, sendo esse o primeiro.

Os quatro SNPs selecionados para esse estudo foram investigados e descritos em um estudo anterior, por Salviano-Silva et al. (2016). Os SNPs *rs861256\*G* e *rs831625\*G* estão localizados no intron 3 e flanqueiam o exon alternativo 3, que faz parte da principal isoforma da proteína CD59, e o exon codificante 5. Partiu-se do pressuposto que variações genéticas no intron 3 poderiam influenciar no processamento alternativo do transcrito primário e, dessa forma, aumentar ou diminuir a expressão da principal isoforma de CD59 (expressa nas superfícies celulares).

A região 3'UTR é importante para a regulação da expressão gênica. Fatores nucleares, que atuam como proteínas repressoras, podem se ligar a essa região para inibir a transcrição do gene. Variações genéticas em 3'UTR podem aumentar ou diminuir a afinidade de proteínas repressoras a essa região e, assim, interferir na transcrição do gene. Sabe-se também, que SNPs localizados nessa região podem influenciar na ligação de microRNAs (miRNA), pequenos RNAs temporais (stRNA) e pequenos RNAs de interferência (siRNA) ao mRNA e, dessa forma, inibir a sua

tradução ou degradá-lo. Já foram descritos 56 miRNAs que se ligam ao mRNA *CD59*. Considerando que SNPs localizados nessa região podem alterar a expressão gênica, foram selecionados os SNPs *rs704697* e *rs1047581*.

Nossos resultados corroboraram com essas pressuposições. Observamos que os alelos *rs861256\*G* e *rs831625\*G* (localizados no intron 3) aumentam a susceptibilidade para câncer cervical, enquanto que os alelos *rs704697\*G* e *rs1047581\*A* (localizados na região 3'UTR) protegem contra a doença. A associação foi encontrada tanto por meio do teste exato de Fisher, como também pelo teste de regressão logística binária, com correção para idade e ancestralidade. Nesse último, analisamos o efeito dominante, recessivo e aditivo de cada SNP, e a associação com câncer cervical foi significativa para os três efeitos dos quatro alelos. Contudo, notamos que mulheres homozigotas para *rs861256\*G* e *rs831625\*G* são aproximadamente duas vezes mais predispostas a desenvolver câncer cervical que portadoras dos outros alelos.

Observamos ainda associação significativa entre o haplótipo *GGAA* de *CD59*, formado pelos SNPs *rs861256\*G* e *rs831625\*G* (intron 3) e pelos alelos comuns *rs704697\*A* e *rs1047581\*A* (3'UTR), e susceptibilidade para câncer cervical. A associação foi significativa, mesmo com correção para idade e ancestralidade. Também comparamos os efeitos dominante, recessivo e aditivo desse haplótipo com câncer cervical e observamos que *GGAA* recessivo confere um risco maior para o desenvolvimento da doença (OR=7,32 [2,78-19,29]), comparado à *GGAA* dominante (OR=3,00 [1,55-5,81]) e *GGAA* aditivo (OR=2,89 [1,80-4,64]).

Portanto, sugerimos que os alelos *rs861256\*G* e *rs831625\*G* e o haplótipo *GGAA* tem um efeito semidominante sobre a expressão da proteína *CD59*. Isso significaria que a expressão da proteína é maior quando *GGAA* ocorre em homozigose, intermediária quando esse haplótipo ocorre em heterozigose e menor, na ausência desse haplótipo. Ainda mais, sugerimos que mulheres homozigotas para esse haplótipo apresentam um risco maior para o desenvolvimento de câncer cervical que mulheres heterozigotas. Já aquelas que não apresentam esse haplótipo, apresentam maior proteção contra a doença.

Sugerimos que os alelos *rs861256\*G* e *rs831625\*G*, devido a sua localização no intron 3, favorecem a expressão da principal isoforma de mRNA de *CD59*, o *CD59-001*, que codifica a proteína *CD59* do SC. Através da ferramenta online *Human Splicing Finder* (Desmet et al., 2009), foi possível prever que ambos alelos,

*rs861256\*G* e *rs831625\*G*, estão localizados em uma região reconhecida por um potenciador de processamento exônico.

Em relação à região 3'UTR, onde os SNPs *rs704697\*G* e *rs1047581\*G* estão inseridos, é possível que ela seja reconhecida por proteínas repressoras e que esses SNPs aumentem a afinidade das proteínas pela região. Ou ainda, que miRNAs podem se ligar mais fortemente ao mRNA, quando esses SNPs estão presentes, e degradá-lo ou inibir a sua tradução. Por meio do programa MirSNP Browser (LIU et al., 2012), foi possível verificar que o alelo *rs1047581\*G* pode aumentar a ligação de miR-330-3p ao mRNA *CD59*. Portanto, sugerimos que os alelos *rs704697\*G* e *rs1047581\*G* diminuem a expressão de *CD59*, enquanto que os alelos *rs704697\*A* e *rs1047581\*A* aumentam a expressão da proteína.

Esses mesmos SNPs foram analisados também em pacientes com NIC de alto grau. De acordo com os resultados da análise de comparação realizada com o teste exato de Fisher, incluindo as pacientes e o grupo de comparação, houve associação entre NIC de alto grau e os alelos *rs861256\*G* e *rs831625\*G* (intron 3) e *rs704697G* (3'UTR). Da mesma forma, como em câncer cervical, os nossos resultados indicam que os dois primeiros alelos são marcadores de susceptibilidade para a doença e o último, marcador para proteção. Contudo, quando comparamos as frequências alélicas e haplotípicas entre os dois grupos por meio do teste de regressão logística binária, com correção para idade e ancestralidade, não houve associação. É importante considerar que entre as pacientes com NIC de alto grau, estão presentes mulheres com o diagnóstico NIC 2, que pode progredir, mas não necessariamente, para câncer cervical. Dessa forma, é esperado que a associação entre os SNPs investigados e o haplótipo *GGAA* de *CD59* e NIC de alto grau seja menor que a associação dos mesmos com câncer cervical.

O haplótipo *GGAA*, assim como o alelo *rs861256\*G* inserido nele, foram anteriormente associados com maior expressão de mRNA *CD59* em mulheres (SALVIANO-SILVA; PETZL-ERLER; BOLDT, 2017). Sabe-se, que concentrações elevadas de mRNA podem indicar concentrações elevadas da proteína. Sendo assim, e considerando que a expressão dessa proteína foi elevada na superfície celular de diversas células malignas, sugerimos que *GGAA* aumenta de fato a expressão da proteína *CD59* e, portanto, aumenta o risco para o desenvolvimento de câncer. Porém, mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

## 6 CONCLUSÕES

- Os SNPs e haplótipos do gene *MASP2* não se mostraram associados com NIC de alto grau ou câncer do colo do útero;
- Não houve associação entre os haplótipos de *MASP2* e as concentrações séricas de MASP-2 em mulheres com NIC de alto grau;
- Os SNPs *rs861256\*G* e *rs831625\*G* no intron 3 de *CD59* foram associados com susceptibilidade para câncer cervical, enquanto que os SNPs *rs704697\*A* e *rs1047581\*A* da região não traduzida 3' de *CD59*, com proteção contra a doença;
- O haplótipo *CD59\*GGAA* foi associado com susceptibilidade para câncer cervical;
- É possível que o haplótipo *CD59\*GGAA* tenha um efeito semidominante sobre a expressão da proteína;
- Mulheres homozigotas para *CD59\*GGAA* são aproximadamente duas a três vezes mais predispostas ao câncer cervical que as mulheres portadoras dos outros haplótipos.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA, J. et al. Molecular basis for a link between complement and the vascular complications of diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 10, p. 5450-5, 9 maio 2000.
- ALEGRETTI, A. P. et al. Diminished Expression of Complement Regulatory Proteins on Peripheral Blood Cells from Systemic Lupus Erythematosus Patients. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1-9, 2012.
- AMET, T. et al. Glycosylphosphatidylinositol Anchor Deficiency Attenuates the Production of Infectious HIV-1 and Renders Virions Sensitive to Complement Attack. **AIDS research and human retroviruses**, v. 32, n. 10-11, p. 1100-1112, [s.d.].
- AMET, T. et al. CD59 incorporation protects hepatitis C virus against complement-mediated destruction. **Hepatology**, v. 55, n. 2, p. 354-363, fev. 2012a.
- ARRUDA, M. M. DE A. S. et al. [Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: from physiopathology to treatment]. **Revista da Associação Médica Brasileira (1992)**, v. 56, n. 2, p. 214-21, [s.d.].
- BELLONE, S. et al. Downregulation of membrane complement inhibitors CD55 and CD59 by siRNA sensitises uterine serous carcinoma overexpressing Her2/neu to complement and antibody-dependent cell cytotoxicity in vitro: implications for trastuzumab-based immunotherapy. **British Journal of Cancer**, v. 106, n. 9, p. 1543-1550, 24 abr. 2012.
- BELTRAME, M. H. et al. MBL-associated serine proteases (MASPs) and infectious diseases. **Molecular Immunology**, v. 67, n. 1, p. 85-100, set. 2015.
- BOLDT, A. B. W. et al. Multiplex sequence-specific polymerase chain reaction reveals new MASP2 haplotypes associated with MASP-2 and MAp19 serum levels. **Human Immunology**, v. 72, n. 9, p. 753-60, jun. 2011.
- BOLDT, A. B. W. et al. Leprosy association with low MASP-2 levels generated by MASP2 haplotypes and polymorphisms flanking MAp19 exon 5. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e69054, 2013.
- BOLDT, A. B. W. et al. MASP1 and MASP2. In: **Encyclopedia of Signaling Molecules**. New York, NY: Springer New York, 2016a. p. 1-18.
- BOLDT, A. B. W. et al. A dual role for Mannan-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP-2) in HIV infection. **Molecular immunology**, v. 78, p. 48-56, out. 2016b.
- 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, ago. 2014.
- CLAYTON, A. et al. Antigen-presenting cell exosomes are protected from

complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. **European journal of immunology**, v. 33, n. 2, p. 522-31, fev. 2003.

COELHO, A. V. C. et al. Mannose binding lectin and mannose binding lectin-associated serine protease-2 genes polymorphisms in human T-lymphotropic virus infection. **Journal of medical virology**, v. 85, n. 10, p. 1829-35, out. 2013.

COLOTTA, F. et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 7, p. 1073-81, 1 jul. 2009.

DAVIES, A. et al. CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 170, n. 3, p. 637-54, 1 set. 1989.

DEGN, S. E. et al. MAp44, a Human Protein Associated with Pattern Recognition Molecules of the Complement System and Regulating the Lectin Pathway of Complement Activation. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 11, p. 7371-7378, 1 dez. 2009.

DEGN, S. E. et al. MAp19, the alternative splice product of the MASP2 gene. **Journal of Immunological Methods**, v. 373, n. 1-2, p. 89-101, 28 out. 2011.

DEGN, S. E. et al. Co-Complexes of MASP-1 and MASP-2 Associated with the Soluble Pattern-Recognition Molecules Drive Lectin Pathway Activation in a Manner Inhibitable by MAp44. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 3, p. 1334-1345, 1 ago. 2013.

DESMET, F.O.; HAMROUN, D.; LALANDE, M.; COLLOD-BÉROUD, G.; CLAUSTRÉS, M.; BÉROUD, C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. **Nucleic Acids Res**, maio 2009.

DOBÓ, J. et al. MASP-3 is the exclusive pro-factor D activator in resting blood: the lectin and the alternative complement pathways are fundamentally linked. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 31877, 18 out. 2016.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**, v. 20, n. 1, p. 34-50, 15 jan. 2010.

ENCODE PROJECT CONSORTIUM, T. E. P. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. **Science (New York, N.Y.)**, v. 306, n. 5696, p. 636-40, 22 out. 2004.

ENSEMBLE. **Gene: CD59 (ENSG0000085063) - Summary - Homo sapiens - Ensembl genome browser 91.** Disponível em: <[https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG0000085063;r=11:33698261-33736445](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG0000085063;r=11:33698261-33736445)>. Acesso em: 11 jan. 2018.

FALK, R. J. et al. Ultrastructural localization of the membrane attack complex of complement in human renal tissues. **American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 9, n. 2, p. 121-8, fev. 1987.

FISCH, U. P. et al. Mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 in children with cancer. **Swiss medical weekly**, v. 141, p. w13191, 29 abr. 2011.

FORSBERG, U. H. et al. Gene for human CD59 (likely Ly-6 homologue) is located on the short arm of chromosome 11. **Immunogenetics**, v. 30, n. 3, p. 188-93, 1989.

GIUS, D. et al. Profiling microdissected epithelium and stroma to model genomic signatures for cervical carcinogenesis accommodating for covariates. **Cancer research**, v. 67, n. 15, p. 7113-23, 1 ago. 2007.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 19 mar. 2010.

HEJA, D. et al. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 26, p. 10498-10503, 26 jun. 2012.

HILLMEN, P. et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **The New England journal of medicine**, v. 350, n. 6, p. 552-9, 5 fev. 2004.

HÖCHSMANN, B.; SCHREZENMEIER, H. Congenital CD59 Deficiency. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 29, n. 3, p. 495-507, jun. 2015.

HU, W. et al. A high-affinity inhibitor of human CD59 enhances complement-mediated virolysis of HIV-1: implications for treatment of HIV-1/AIDS. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 184, n. 1, p. 359-68, 1 jan. 2010.

HU, W. et al. Polymorphisms in pattern-recognition genes in the innate immunity system and risk of non-Hodgkin lymphoma. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 54, n. 1, p. 72-77, jan. 2013.

INCA. **INCA - Câncer - Tipo - Colo do Útero - HPV e câncer - Perguntas mais frequentes**. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo\\_uterio/hpv-cancer-perguntas-mais-frequentes](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/hpv-cancer-perguntas-mais-frequentes)>. Acesso em: 10 jan. 2018a.

INCA. **INCA - Câncer - Tipo - Colo do Útero**. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo\\_uterio/definicao](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/definicao)>. Acesso em: 10 jan. 2018b.

INCA. **INCA - Ações e Programas no Brasil - Controle do Câncer do Colo do Útero**. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes\\_programas/site/home/nobrasil/programa\\_nacional\\_controle\\_cancer\\_colo\\_uterio/conceito\\_magnitude](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_nacional_controle_cancer_colo_uterio/conceito_magnitude)>. Acesso em: 10 jan. 2018c.

**INCA - Câncer - Tipo - Colo do Útero - HPV e câncer - Perguntas mais frequentes.** Disponível em:

<[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo\\_uterio/hpv-cancer-perguntas-mais-frequentes](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/hpv-cancer-perguntas-mais-frequentes)>. Acesso em: 10 jan. 2018.

KAPLAN, M. Eculizumab (Alexion). **Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)**, v. 3, n. 7, p. 1017-23, jul. 2002.

KERR, F. K. et al. Elucidation of the substrate specificity of the MASP-2 protease of the lectin complement pathway and identification of the enzyme as a major physiological target of the serpin, C1-inhibitor. **Molecular immunology**, v. 45, n. 3, p. 670-7, fev. 2008.

KESSELRING, R. et al. The complement receptors CD46, CD55 and CD59 are regulated by the tumour microenvironment of head and neck cancer to facilitate escape of complement attack. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 50, n. 12, p. 2152-61, ago. 2014.

KIMBERLEY, F. C.; SIVASANKAR, B.; PAUL MORGAN, B. Alternative roles for CD59. **Molecular immunology**, v. 44, n. 1-3, p. 73-81, jan. 2007.

KINDERLERER, A. R. et al. Statin-induced expression of CD59 on vascular endothelium in hypoxia: a potential mechanism for the anti-inflammatory actions of statins in rheumatoid arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 8, n. 4, p. R130, 2006.

KJAER, T. R. et al. Structural insights into the initiating complex of the lectin pathway of complement activation. **Structure (London, England : 1993)**, v. 23, n. 2, p. 342-51, 3 fev. 2015.

KJAER, T. R.; THIEL, S.; ANDERSEN, G. R. Toward a structure-based comprehension of the lectin pathway of complement. **Molecular Immunology**, v. 56, n. 4, p. 413-422, dez. 2013.

KONTTINEN, Y. T. et al. Complement in acute and chronic arthritides: assessment of C3c, C9, and protectin (CD59) in synovial membrane. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 55, n. 12, p. 888-94, dez. 1996.

KRUS, U. et al. The Complement Inhibitor CD59 Regulates Insulin Secretion by Modulating Exocytotic Events. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 5, p. 883-890, maio 2014.

LEE, S. Y. et al. A Panel of Genetic Polymorphism for the Prediction of Prognosis in Patients with Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer after Surgical Resection. 2015.

LEUNG, T. H.-Y. et al. Human papilloma virus E6 protein enriches the CD55(+) population in cervical cancer cells, promoting radioresistance and cancer aggressiveness. **The Journal of Pathology**, 19 dez. 2017.

LI, B. et al. CD59 is overexpressed in human lung cancer and regulates apoptosis of human lung cancer cells. **International journal of oncology**, v. 43, n. 3, p. 850-8, set. 2013.

LIU, C.; ZHANG, F.; LI, T.; LU, M.; WANG, L.; YUE, W.; ZHANG, D. MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs. **BMC Genomics**, nov. 2012.

LIU, F. et al. Deficiency of the complement regulatory protein CD59 accelerates the development of diabetes-induced atherosclerosis in mice. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 31, n. 2, p. 311-317, fev. 2017.

LONGHI, M. P. et al. Cutting edge: murine CD59a modulates antiviral CD4+ T cell activity in a complement-independent manner. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 11, p. 7098-102, 1 dez. 2005.

MAMIDI, S. et al. Lipoplex mediated silencing of membrane regulators (CD46, CD55 and CD59) enhances complement-dependent anti-tumor activity of trastuzumab and pertuzumab. **Molecular oncology**, v. 7, n. 3, p. 580-94, jun. 2013.

MAMIDI, S.; HÖNE, S.; KIRSCHFINK, M. The complement system in cancer: Ambivalence between tumour destruction and promotion. **Immunobiology**, v. 222, n. 1, p. 45-54, jan. 2017.

MEVORACH, D. et al. Therapy with eculizumab for patients with CD59 p.Cys89Tyr mutation. **Annals of Neurology**, v. 80, n. 5, p. 708-717, nov. 2016.

MØLLER-KRISTENSEN, M. et al. Levels of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 in healthy individuals. **Journal of immunological methods**, v. 282, n. 1-2, p. 159-67, nov. 2003.

MONLEÓN, I. et al. CD59 cross-linking induces secretion of APO2 ligand in overactivated human T cells. **European journal of immunology**, v. 30, n. 4, p. 1078-87, abr. 2000.

NEVO, Y. et al. CD59 deficiency is associated with chronic hemolysis and childhood relapsing immune-mediated polyneuropathy. **Blood**, v. 121, n. 1, p. 129-35, 3 jan. 2013.

NGUYEN, D. H.; HILDRETH, J. E. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. **Journal of virology**, v. 74, n. 7, p. 3264-72, abr. 2000.

NINOMIYA, H.; SIMS, P. J. The human complement regulatory protein CD59 binds to the alpha-chain of C8 and to the "domain of C9. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 19, p. 13675-80, 5 jul. 1992.

OUYANG, Q. et al. The membrane complement regulatory protein CD59 promotes tumor growth and predicts poor prognosis in breast cancer. **International journal of oncology**, v. 48, n. 5, p. 2015-24, maio 2016a.

OUYANG, Q. et al. The membrane complement regulatory protein CD59 promotes tumor growth and predicts poor prognosis in breast cancer. **International journal of oncology**, v. 48, n. 5, p. 2015-24, maio 2016b.

PETRANKA, J. G. et al. Structure of the CD59-encoding gene: further evidence of a relationship to murine lymphocyte antigen Ly-6 protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 17, p. 7876-9, 1 set. 1992.

QIAN, B.-Z.; POLLARD, J. W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39-51, abr. 2010.

QIN, X. et al. Glycation inactivation of the complement regulatory protein CD59: a possible role in the pathogenesis of the vascular complications of human diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 10, p. 2653-61, out. 2004.

RICKLIN, D. et al. Complement -a key system for immune surveillance and homeostasis. [s.d.].

ROMAGNOLI, P.; BRON, C. Defective TCR signaling events in glycosylphosphatidylinositol-deficient T cells derived from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients. **International immunology**, v. 11, n. 9, p. 1411-22, set. 1999.

ROSBJERG, A. et al. Heterocomplex formation between MBL/ficolin/CL-11-associated serine protease-1 and -3 and MBL/ficolin/CL-11-associated protein-1. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 192, n. 9, p. 4352-60, 1 maio 2014.

SAIFUDDIN, M. et al. Role of virion-associated glycosylphosphatidylinositol-linked proteins CD55 and CD59 in complement resistance of cell line-derived and primary isolates of HIV-1. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. 2, p. 501-9, 1 ago. 1995.

SALVIANO-SILVA, A.; PETZL-ERLER, M. L.; BOLDT, A. B. W. CD59 polymorphisms are associated with gene expression and different sexual susceptibility to pemphigus foliaceus. **Autoimmunity**, v. 50, n. 6, p. 377-385, 18 set. 2017.

SASAGAWA, T.; TAKAGI, H.; MAKINODA, S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 18, n. 6, p. 807-815, dez. 2012.

SCHMIDT, C. Q.; LAMBRIS, J. D.; RICKLIN, D. Protection of host cells by complement regulators. [s.d.].

SCHMIDT, C. Q.; LAMBRIS, J. D.; RICKLIN, D. Protection of host cells by complement regulators. **Immunological Reviews**, v. 274, n. 1, p. 152-171, nov. 2016.

SHANG, Y. et al. Systematic Immunohistochemical Analysis of the Expression of CD46, CD55, and CD59 in Colon Cancer. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 138, n. 7, p. 910-919, jul. 2014.

SKJOEDT, M.-O. et al. Crystal Structure and Functional Characterization of the Complement Regulator Mannose-binding Lectin (MBL)/Ficolin-associated Protein-1 (MAP-1). **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 39, p. 32913-32921, 21 set. 2012.

SOOD, R. et al. Gene expression patterns in human placenta. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 14, p. 5478-5483, 4 abr. 2006.

SØRENSEN, R.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. **Springer seminars in immunopathology**, v. 27, n. 3, p. 299-319, 28 nov. 2005.

SPEAR, G. T. et al. Host cell-derived complement control proteins CD55 and CD59 are incorporated into the virions of two unrelated enveloped viruses. Human T cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) and human cytomegalovirus (HCMV). **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 155, n. 9, p. 4376-81, 1 nov. 1995.

STENGAARD-PEDERSEN, K. et al. Inherited Deficiency of Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease 2. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 6, p. 554-560, 7 ago. 2003.

STOVER, C. M. et al. Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 6, p. 3481-90, 15 mar. 1999.

SUZUKI, M. et al. CD8+CD45RA+CCR7+FOXP3+ T Cells with Immunosuppressive Properties: A Novel Subset of Inducible Human Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 5, p. 2118-2130, 1 set. 2012.

SWIERZKO, A. ST. et al. Mannose-Binding Lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2) in women with malignant and benign ovarian tumours. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 63, n. 11, p. 1129-1140, 20 nov. 2014.

TAKAHASHI, M. et al. A truncated form of mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway. **International immunology**, v. 11, n. 5, p. 859-63, maio 1999.

THE GTEX PORTAL. Disponível em: <<https://gtexportal.org>>. Acesso em 2018.

THE HUMAN PROTEIN ATLAS. **Expression of CD59 in cancer - Summary - The Human Protein Atlas**. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000085063-CD59/pathology>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

THIEL, S. et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. **Nature**, v. 386, n. 6624, p. 506-10, 3 abr. 1997.

THIEL, S. et al. Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. **Genes and Immunity**, v. 8, n. 2, p. 154-163, 25 mar. 2007.

THIEL, S. Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 16, p. 3875-3888, set. 2007.

THIEL, S. et al. Polymorphisms in Mannan-Binding Lectin (MBL)-Associated Serine Protease 2 Affect Stability, Binding to MBL, and Enzymatic Activity. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 5, p. 2939-2947, 1 mar. 2009.

TULIO, S. et al. MASP2 gene polymorphism is associated with susceptibility to hepatitis C virus infection. **Human Immunology**, v. 72, n. 10, p. 912-915, out. 2011a.

TULIO, S. et al. MASP2 gene polymorphism is associated with susceptibility to hepatitis C virus infection. **Human Immunology**, v. 72, n. 10, p. 912-915, out. 2011b.

UHLÉN, M. et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 347, n. 6220, p. 1260419, 23 jan. 2015.

UZAWA, A. et al. Increased levels of CSF CD59 in neuromyelitis optica and multiple sclerosis. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 453, p. 131-3, 30 jan. 2016.

VALLÈS, X. et al. Genetic and structural analysis of MBL2 and MASP2 polymorphisms in south-eastern African children. **Tissue antigens**, v. 74, n. 4, p. 298-307, out. 2009.

VAN DE WALL, S.; NIJMAN, H. W.; DAEMEN, T. HPV-specific immunotherapy: key role for immunomodulators. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 14, n. 2, p. 265-79, fev. 2014.

VANDERPLASSCHEN, A. et al. Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 13, p. 7544-9, 23 jun. 1998.

VERMA, A. et al. Clinical significance of mannose-binding lectin-associated serine protease-2 expression in esophageal squamous cell carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 12, p. 2930-2935, 15 jun. 2006.

WANG, H.-L. et al. Association of MBL2 exon1 polymorphisms with high-risk human papillomavirus infection and cervical cancers: a meta-analysis. **Archives of**

**Gynecology and Obstetrics**, v. 294, n. 6, p. 1109-1116, 13 dez. 2016.

WHO. WHO | Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. **WHO**, 2016.

WILLIAMS, A. S. et al. Deletion of the gene encoding CD59a in mice increases disease severity in a murine model of rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 50, n. 9, p. 3035-44, set. 2004.

WU, G. et al. Complement Regulator CD59 Protects Against Atherosclerosis by Restricting the Formation of Complement Membrane Attack Complex. **Circulation Research**, v. 104, n. 4, p. 550-558, 2 jan. 2009.

YANG, L. B. et al. Deficiency of complement defense protein CD59 may contribute to neurodegeneration in Alzheimer's disease. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 20, p. 7505-9, 15 out. 2000.

YTTING, H. et al. Serum mannan-binding lectin-associated serine protease 2 levels in colorectal cancer: relation to recurrence and mortality. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 4, p. 1441-6, 15 fev. 2005.

YTTING, H. et al. Biological variation in circulating levels of mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 and the influence of age, gender and physical exercise. **Scandinavian journal of immunology**, v. 66, n. 4, p. 458-64, out. 2007.

YTTING, H. et al. Pre- and postoperative levels in serum of mannan-binding lectin associated serine protease-2 –a prognostic marker in colorectal cancer. **Human Immunology**, v. 69, n. 7, p. 414-420, jul. 2008.

YTTING, H. et al. Mannan-Binding Lectin (MBL) and MBL-Associated Serine Protease 2 (MASP-2) Genotypes in Colorectal Cancer. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, n. 2, p. 122-127, fev. 2011.

ZALMAN, L. S. et al. Deficiency of the homologous restriction factor in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **The Journal of experimental medicine**, v. 165, n. 2, p. 572-7, 1 fev. 1987.

**APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
(TCLE)**

## 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 intraepitelial 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 parafinados com amostras de biópsias ou tumor, 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. O principal investigador é Stefanie Epp Boschmann, que pode ser encontrado no endereço Rua General Carneiro, 181 ou pelo telefone (41) 3360-1800 (ramal 6537). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), no Hospital Erasto Gaertner- R Dr. Ovande do Amaral, 201. – Bairro Jardim das Américas – Fone: (41) 3361-5271.

6. 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.
7. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outras pacientes. Não iremos divulgar seu nome quando os resultados do estudo forem publicados.
8. 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).
9. 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.
10. 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.
11. 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. Stefanie Epp Boschmann 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

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**APÊNDICE B – INSTRUMENTO UTILIZADO PARA COLETA DE DADOS**

**QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS**

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Estado civil: \_\_\_\_\_

1. Escolaridade:  Fundamental Incompleto  
 Fundamental Completo  
 Médio Incompleto  
 Médio Completo  
 Superior Incompleto  
 Superior Completo
2. Ancestralidade:  Branco  
 Negro  
 Pardo (branco brasileiro)  
 Asiático
3. Número de gestações: \_\_\_\_\_
4. Idade ao 1º. parto: \_\_\_\_\_
5. Idade na 1ª. relação sexual: \_\_\_\_\_
6. Faz uso de preservativo?  
 Não  
 Sim. Há quanto tempo usa? \_\_\_\_\_  
Em que idade começou a usar: \_\_\_\_\_
7. Faz uso de contraceptivo?  
 Não  
 Sim. Há quanto tempo usa? \_\_\_\_\_  
Em que idade começou a usar: \_\_\_\_\_
8. É usuária de DIU?  
 Não  
 Sim. Há quanto tempo usa? \_\_\_\_\_  
Em que idade começou a usar: \_\_\_\_\_
9. É fumante? \_\_\_\_\_  
 Não  
 Sim. Há quanto tempo usa? \_\_\_\_\_

Número de cigarros por dia: \_\_\_\_\_

10. Caso é ex-fumante, há quanto tempo parou? \_\_\_\_\_

Durante quanto tempo fumou? \_\_\_\_\_

11. Antecedentes de DST:

( ) Não

( ) Sim. Qual? \_\_\_\_\_

12. Cauterização prévia:

( ) Não

( ) Sim: ( ) Colo ( ) Vagina ( ) Vulva ( ) Ânus

13. Antecedentes de câncer:

( ) Não

( ) Sim: Tipo de câncer: \_\_\_\_\_

Idade ao diagnóstico: \_\_\_\_\_

Tempo de tratamento: \_\_\_\_\_

14. Antecedentes familiares de câncer:

Quem? Qual tipo? \_\_\_\_\_

15. Você tem alguma alergia? \_\_\_\_\_

Se sim, ao que? \_\_\_\_\_

16. Faz uso de medicamentos? \_\_\_\_\_

Sim. Qual (is):

17. Você realiza o preventivo anualmente?

( ) Não

( ) Sim

Observações:

---

---

---