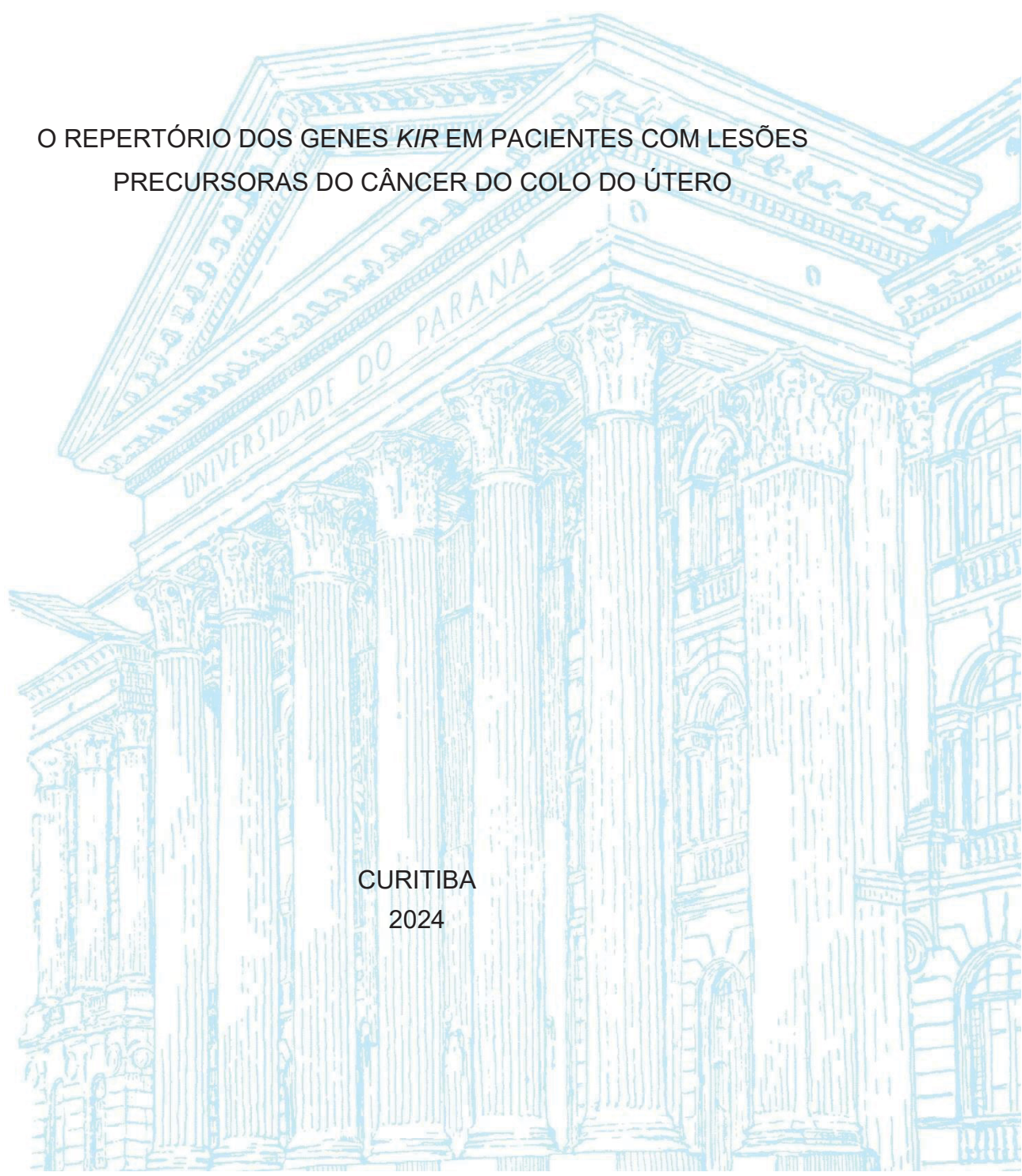


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCIANE ROCHA ERNLUND PANGRACIO

O REPERTÓRIO DOS GENES *KIR* EM PACIENTES COM LESÕES
PRECURSORAS DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

CURITIBA
2024



LUCIANE ROCHA ERNLUND PANGRACIO

O REPERTÓRIO DOS GENES *KIR* EM PACIENTES COM LESÕES
PRECURSORAS DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Tocoginecologia e Saúde da Mulher do
Setor de Ciências da Saúde do Hospital de
Clínicas da Universidade Federal do
Paraná, como requisito para obtenção do
Título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Maria da Graça
Bicalho

Coorientador: Dr. Newton S. Carvalho

CURITIBA

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

P191 Pangrácio, Luciane Rocha Ernlund

O repertório dos genes kir em pacientes com lesões precursoras do câncer do colo do útero. [recurso eletrônico] / Luciane Rocha Ernlund Pangrácio. – Curitiba, 2024.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia e Saúde da Mulher. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho

Coorientador: Prof. Dr. Newton S. Carvalho

1. Papillomavirus humano. 2. Receptores KIR. 3. Neoplasias do colo do útero. 4. Displasia do colo do útero. I. Bicalho, Maria da Graça. II. Carvalho, Newton S. III. Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia e Saúde da Mulher. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLM QZ 365

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

TERMO DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO TOCGINECOLOGIA E
SAÚDE DA MULHER - 40001016084P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação TOCGINECOLOGIA E SAÚDE DA MULHER da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LUCIANE ROCHA ERNLUND PANGRACIO** intitulada: **O repertório dos genes KIR em pacientes com lesões precursoras do câncer do colo do útero**, sob orientação da Profa. Dra. MARIA DA GRAÇA BICALHO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 01 de Novembro de 2024.

Assinatura Eletrônica
19/11/2024 16:56:49.0
MARIA DA GRAÇA BICALHO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
18/11/2024 20:41:35.0
IRIS RABINOVICH
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
20/11/2024 19:28:32.0
MERI BORDIGNON NOGUEIRA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
18/11/2024 16:02:24.0
LEONARDO MALDANER AMORIM
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma maneira me ajudaram para a realização deste trabalho.

À Prof. Maria da Graça Bicalho, minha imensa e especial gratidão. Sua orientação, presença e palavras nos momentos certos foram essenciais para tornar possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Newton Sergio Carvalho, muito grata por ter contado com seu apoio na estruturação e delineamento deste projeto.

À Prof. Patricia Savio de Araujo Souza, pelo apoio e experiências trocadas. Sua presença foi fundamental na viabilização deste estudo. Gratidão!

Ao Prof. Juarez Gabardo (*in memorian*) minha profunda gratidão pela valiosa contribuição na organização dos dados e pela oportunidade única de conhecê-lo. Sua partida inesperada deixa grande saudade.

Ao Waldir Antônio Silva, minha sincera gratidão pelo tempo a mim disponibilizado na estruturação dos dados e pela oportunidade de convívio com pessoa tão especial.

Ao Ricardo Rasmussen Petterle pela dedicação nas comparações e análises de dados. Sou muito grata a você.

Ao Paulo Rincoski Costantino, sua presença diária foi essencial. Contar com sua parceria no preparo, organização e execução da parte prática foi muito importante para a realização deste trabalho. Minha sincera gratidão.

À Suelen Zeck, gratidão por seu apoio na logística e organização dos insumos necessários e pelo convívio diário. Sua presença trouxe leveza aos dias de prática no laboratório.

Aos amigos que fiz no LIGH. Contar com a amizade e compreensão de cada um de vocês, disponibilizando espaço e tempo na bancada do laboratório, foi fundamental. Muito grata a vocês: Alessandro, Joandrei, Maria Eduarda, Paulo, Renata, Samuel e Suelen.

Ao Leonardo Amorim, muito grata por ter contado com você nos momentos de dúvidas na execução da parte prática e por todas as valiosas sugestões.

Ao Laboratório LabCHO e Laboratório LGMH, minha gratidão pela disponibilização dos equipamentos e pelo socorro nos momentos certos.

Ao Hospital Erasto Gaertner e equipes de atendimento, em especial ao Dr.

Carlos Afonso Maestri e Dr. Sergio Ossamu Ioshii, meus sinceros agradecimentos. À Secretaria de Saúde de Campo Largo e profissionais envolvidos no atendimento às pacientes participantes do estudo, minha gratidão.

Às alunas de iniciação científica Ana Clara Castilho e Natalia Angelica Petry, gratidão por ter contato com vocês.

Ao Convênio FUNPAR-LIGH pelo apoio financeiro.

A todas as mulheres participantes deste estudo, meus sinceros agradecimentos.

A cada mulher em sua singularidade e em especial às acometidas por este diagnóstico tão comprometedor da saúde feminina no seu sentido mais amplo, minha homenagem especial. As batalhas de uma mulher são entendidas somente por elas próprias.

Ao meu marido, Mario José, meu amor e companheiro de todos os momentos e a meus filhos Leticia e Luiz Eduardo, suas presenças em minha vida são o alicerce para prosseguir sempre em busca de novos horizontes.

A meus pais, Rita de Cássia e Valdir, luz no meu caminho desde os primeiros passos, gratidão eterna. O exemplo e amor de vocês pavimentaram cada ladrilho desta estrada que se chama Vida.

A Deus, por sua presença em cada momento de minha caminhada.

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existir.”

Albert Einstein

RESUMO

O câncer cervical (CC) está entre as neoplasias de maior prevalência entre as mulheres, especialmente em países com baixos índices socioeconômicos. Infecções persistentes pelo HPV oncogênico são a principal causa para o desenvolvimento do CC. As células *Natural Killer* (NK) protagonizam importante papel citotóxico dirigido a células infectadas por vírus, sob estresse celular e células-alvo tumorais. O controle de sua ação citotóxica advém de sinais provenientes da interação de receptores inibidores e ativadores expressos em sua membrana, em especial os receptores *KIR* (*Killer immunoglobulin like receptor*) e sua interação com ligantes *HLA* expressos nas células alvo. O presente estudo teve como objetivo investigar e comparar a variabilidade individual na composição do repertório de genes *KIR*, genótipos/haplótipos e suas frequências, em mulheres com lesões intraepiteliais cervicais de grau 2 e 3 e controles HPV (+) e HPV (-), bem como sua associação com proteção ou suscetibilidade à infecção pelo HPV de alto risco e no desenvolvimento das lesões precursoras do câncer do colo do útero. Foi selecionada uma amostragem randomizada totalizando 447 mulheres assim classificadas: 90 mulheres com diagnóstico de NIC2, 94 mulheres com NIC3 e dois grupos controles compostos por 70 mulheres HPV (+) e 193 mulheres HPV (-), com citologia cervical normal. O repertório *KIR* foi definido por amplificação multiplex do DNA com a utilização de pares de primers sequências específicas (PCR-SSP). Ao todo 78 genótipos foram encontrados neste estudo, sendo que 5 deles ainda não se encontram catalogados na AFND para a população brasileira. Foram feitas análises comparativas entre os grupos e observou-se que pelo critério de presença de infecção, o gene *KIR2DS2* ($p < 0,001$) apresentou frequência maior nas infectadas e o gene *KIR2DL2* ($p = 0,03$) no grupo das não infectadas. Pela análise das mulheres HPV (+) estratificadas pela presença ou não de lesão precursora, os genes *KIR2DL2*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1* e *KIR2DS2* apresentaram maiores frequências no grupo com lesão ($p < 0,001$). Na análise comparativa entre os grupos HPV (+) sem lesão e HPV (-), os genes *KIR2DL2*, *KIR2DL5* e *KIR2DS1* apresentaram maiores frequências nas não infectadas ($p < 0,001$). Tanto nos grupos de mulheres com lesões precursoras quanto nos grupos de mulheres sem lesão (infectadas ou não) o genótipo ativador Bx mostrou-se mais frequente, porém sem diferença estatística entre os grupos. Lesões precursoras NIC2 e NIC3 não apresentaram diferença relativamente a nenhum dos genes. Em conclusão, pelo presente estudo sugere-se que o gene ativador *KIR2DS1* seria capaz de conferir proteção para a infecção pelo HPV, mas quando a infecção já está presente, assim como com o gene *KIR2DS2*, ele está positivamente associado à presença de lesão precursora do câncer cervical. Quanto aos genes inibidores *KIR2DL2* e *KIR2DL5* sugere-se que estejam associados com proteção à infecção pelo HPV, porém quando a infecção está presente, estão positivamente associados ao desenvolvimento da lesão precursora.

Palavras-chave: HPV; KIR; câncer cervical; neoplasia intraepitelial cervical.

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is one of the most prevalent neoplasms among women, especially in countries with low socioeconomic indices. Persistent infections with oncogenic HPV are the main cause of the development of CC. Natural Killer (NK) cells play an important cytotoxic role directed at cells infected by viruses, under cellular stress, and tumor target cells. The control of its cytotoxic action comes from signals from the interaction of inhibitory and activating receptors expressed on its membrane, especially KIR (Killer immunoglobulin-like receptor) receptors and their interaction with HLA ligands expressed on target cells. The present study aimed to investigate and compare individual variability in the composition of the *KIR* gene repertoire, genotypes/haplotypes, and their frequencies, in women with grade 2 and 3 cervical intraepithelial lesions and HPV (+) and HPV (-) controls, as well as its association with protection or susceptibility to high-risk HPV infection and the development of precursor lesions of cervical cancer. A randomized sample was selected totaling 447 women classified as follows: 90 women diagnosed with CIN2, 94 women with CIN3, and two control groups composed of 70 HPV (+) women and 193 HPV (-) women with normal cervical cytology. The *KIR* repertoire was defined by multiplex DNA amplification using sequence-specific primer pairs (PCR-SSP). In total, 78 genotypes were found in this study, 5 of which are not yet cataloged in the AFND for the Brazilian population. Comparative analyses were carried out between the groups, and it was observed that according to the criterion of the presence of infection, gene *KIR2DS2* ($p < 0,001$) presented higher frequency in the infected group, and gene *KIR2DL2* ($p = 0,03$) in uninfected group. By analyzing HPV (+) women stratified by the presence or absence of precursor lesions, the genes *KIR2DL2*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, and *KIR2DS2* were more frequent in the group with lesions ($p < 0,001$). In the comparative analysis between the HPV (+) group without lesion and HPV (-), *KIR2DL2*, *KIR2DL5*, and *KIR2DS1* genes had higher frequencies in the uninfected group ($p < 0,001$). Both in the group of women with precursor lesions and those without lesions (infected or not), the Bx activating genotype was more frequent, but without statistical difference. CIN2 and CIN3 precursor lesions showed no difference concerning any of the genes. In conclusion, the present study suggests that the activating gene *KIR2DS1* would be capable of protecting against HPV infection. Still, when the infection is already present, as it also happens with the *KIR2DS2* gene, it is positively associated with the presence of cancer precursor lesions. Regarding genes *KIR2DL2* and *KIR2DL5* it is suggested that they confer protection against HPV infection, however, when the infection is present, they are positively associated with the development of the precursor lesion.

Keywords: HPV; *KIR*; cervical cancer, cervical intraepithelial neoplasia.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Representação espacial das taxas brutas de incidência da neoplasia maligna do colo do útero por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2023.....	17
FIGURA 2 -	Estrutura e proteínas virais do HPV.....	21
FIGURA 3 -	Modelo esquemático da história natural da infecção pelo HPV e desenvolvimento do câncer cervical.....	22
FIGURA 4 -	Progressão de lesões no epitélio cervical, mediada pelo papilomavirus humano (HPV).....	23
FIGURA 5 -	Evolução das células <i>NK</i>	25
FIGURA 6 -	Base molecular do reconhecimento “ <i>missing-self</i> ” e “ <i>induced-self</i> ” das células <i>NK</i>	26
FIGURA 7 -	Localização cromossômica dos genes <i>KIR</i> dentro do complexo de receptores de leucócitos (LRC).....	28
FIGURA 8 -	Determinação de haplótipos <i>KIR</i> com diferentes combinações de Genes.....	29
FIGURA 9 -	Estrutura proteica dos receptores <i>KIR</i>	30
FIGURA 10 -	Receptores de células <i>NK</i> e seus ligantes.....	32
FIGURA 11 -	Comparação das frequências dos genes <i>KIR</i> nos casos e controles...42	
FIGURA 12 -	Genótipos com maiores frequências nos casos NIC2 e NIC3 e controles HPV(+) e HPV (-).....	47
FIGURA 13 -	Genótipos não constantes do AFND em população brasileira.....	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características demográficas dos casos e controles.....	40
TABELA 2 – Número de indivíduos portadores dos genes <i>KIR</i> , suas frequências e frequências gênicas estimadas em casos e controles.....	41
TABELA 3 - Número de indivíduos portadores dos genes <i>KIR</i> , suas frequências e frequências gênicas estimadas: NIC2, NIC3 e HPV (+) <i>versus</i> HPV (-).....	43
TABELA 4 - Número de indivíduos portadores dos genes <i>KIR</i> , suas frequências e frequências gênicas estimadas: NIC2 e NIC3 <i>versus</i> HPV (+).....	44
TABELA 5 - Número de indivíduos portadores dos genes <i>KIR</i> , suas frequências e frequências gênicas estimadas: controles HPV (+) <i>versus</i> HPV (-).....	45
TABELA 6 - Número de indivíduos portadores dos genes <i>KIR</i> , suas frequências e frequências gênicas estimadas: NIC3 <i>versus</i> NIC2.....	46
TABELA 7 - Frequências genotípicas: casos (NIC2 e NIC3) e controles [HPV (+) e HPV (-)].....	48
TABELA 8 - Frequências genotípicas entre os grupos.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

AFND	<i>Allele Frequency Net Database</i>
CC	Câncer Cervical
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
GALC	<i>Galactosylceramidase</i>
GLOBOCAN	<i>Global Cancer Observatory</i>
HEG	Hospital Erasto Gaertner
HLA	<i>Human Leucocyte Antigens</i> ou Antígenos Leucocitários Humanos
HPV	<i>Human Papillomavirus</i> ou Papilomavírus humano
IC	Intervalo de Confiança
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ITAMs	Imunorreceptor com Motivo Ativador baseado em Tirosina
ITIMs	Imunorreceptor com Motivo Inibidor baseado em Tirosina
KIR	<i>Killer Immunoglobulin Like Receptors</i> ou Receptores Semelhantes à Imunoglobulina das Células <i>Natural Killer</i>
LabCHO	Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética
LCR	<i>Long Control Region</i>
LGMH	Laboratório de Genética Molecular Humana
LIGH	Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade
LRC	<i>Leukocyte Receptor Complex</i> ou Complexo de Receptor de Leucócito
LSIL	<i>Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> ou Lesão Intraepitelial de Baixo Grau
NIC	<i>Neoplasia Intraepithelial Cervical</i>
NK	<i>Natural Killer Cell</i> ou Célula Assassina Natural
OR	Odds ratio
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ou Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-SSP	<i>Polymerase Chain Reaction- Sequence Specific Primers</i>
PCR-SSOP	<i>Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotide robes</i>
SILs	<i>Squamous Intraepithelial Lesions</i> ou Lesão Intraepitelial Escamosa
TCR	<i>T cell Receptor</i> ou Receptor das Células T
UFPR	Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	JUSTIFICATIVA.....	14
1.2	OBJETIVOS	15
1.2.1	Objetivo geral	15
1.2.2	Objetivos específicos	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	CÂNCER CERVICAL	16
2.1.1	Epidemiologia	16
2.1.2	Fatores de risco.....	17
2.1.3	Prevenção e tratamento	18
2.1.4	Agente etiológico	20
2.1.5	História natural da doença.....	22
2.2	CÉLULAS <i>NATURAL KILLER</i> : CARACTERÍSTICAS E BIOLOGIA	23
2.2.1	Imunovigilância mediada por células <i>NK</i>	25
2.2.2	Receptores KIR	27
2.2.3	Antígenos leucocitários humanos (HLA): ligantes de receptores KIR	30
2.3	RECEPTORES KIR E O CÂNCER CERVICAL	33
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	35
3.2	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	35
3.2.1	Critérios de inclusão	35
3.2.2	Critérios de exclusão.....	35
3.3	CONTROLE DE QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE DNA	36
3.4	GENOTIPAGEM DE GENES <i>KIR</i>	37
3.5	ANÁLISE DE DADOS.....	38
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4	RESULTADOS	39
4.1	FREQUÊNCIAS DOS GENES <i>KIR</i> NOS GRUPOS NIC2, NIC3, HPV (+) E HPV (-) INDIVIDUALMENTE.....	41
4.2	AVALIAÇÃO COMPARATIVA DAS FREQUÊNCIAS DOS GENES <i>KIR</i> NOS CASOS (NIC2 E NIC3) E CONTROLES (HPV+ E HPV-)	42
4.2.1	Avaliação comparativa entre os grupos estratificados pelo critério de infecção	

	pelo HPV	42
4.2.2	Avaliação comparativa em mulheres HPV (+) estratificadas pela presença ou não de lesão intraepitelial cervical.....	43
4.2.3	Avaliação comparativa entre grupos de mulheres sem lesão intraepitelial cervical..	44
4.2.4	Avaliação comparativa entre grupos de mulheres com lesão intraepitelial cervical	45
4.3	GENÓTIPOS IDENTIFICADOS NOS CASOS E CONTROLES	46
4.4	AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE GENÓTIPOS <i>K19</i> ENTRE OS GRUPOS DE CASOS E CONTROLES	48
5	DISCUSSÃO	49
5.1	LIMITAÇÕES.....	53
5.2	PERSPECTIVAS	53
6	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS	55
	ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	61
	ANEXO II – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO	63
	ANEXO III – SUPLEMENTO de Amorim <i>et al.</i> , 2018	65
	ANEXO IV – Artigo publicado	66
	APÊNDICE I – GENÓTIPOS IDENTIFICADOS NOS CASOS NIC2 E NIC3 E NOS CONTROLES HPV (+) E HPV (-).....	69

1 INTRODUÇÃO

O Papilomavirus humano (HPV) é o responsável por uma das infecções mais prevalentes de transmissão por via sexual no mundo (BRUNI *et al.*, 2023). Infecções persistentes ocasionadas pelo HPV oncogênico são a principal causa para o desenvolvimento do câncer cervical (GRAU-BEJAR *et al.*, 2023).

O câncer do colo do útero evolui a partir de uma fase pré-maligna com lesões suspeitas identificadas pelo exame citológico. As lesões pré-neoplásicas acometem o epitélio escamoso do trato genital feminino, ocasionando as lesões designadas de neoplasia intraepitelial cervical (NIC), que progridem a partir de lesões de baixo grau (NIC1) até lesões de alto grau, designadas de NIC2 e NIC3 (DOVNIK e POLJAK, 2023).

As células *Natural Killer* (NK) tem papel fundamental na imunovigilância contra infecções virais e processos neoplásicos (BJÖRKSTRÖM, STRUNZ & LJUNGGREN, 2022). Envolvidas na fase precoce da resposta imune, sua função efetora é determinada por um conjunto de receptores de membrana (RIZZO *et al.*, 2021). Os receptores KIR (*Killer Immunoglobulin like receptors*) são fundamentais neste cenário e estão expressos na superfície das células NK regulando seu amadurecimento e função, através da interação com seus ligantes, as moléculas HLA (PARHAM, 2005).

Os receptores KIR são codificados pela família de genes *KIR*, localizada no cromossomo 19, dentro do Complexo de Receptores Leucocitários (KULKARNI *et al.*, 2008). Este complexo gênico é altamente polimórfico e sua diversidade é determinada pelo polimorfismo de presença e ausência, em combinação com polimorfismos haplotípico e alélico. O repertório KIR de um indivíduo é altamente individualizado e determinado fundamentalmente pela combinação de genes que estão presentes em seus cromossomos e suas variações alélicas, determinando seus haplótipos e sua identidade genotípica (UHRBERG, PARHAM & WERNET, 2002).

O período entre a identificação da lesão pré-neoplásica e a sua progressão para o câncer invasivo é de fundamental relevância para a tomada de decisão. Neste contexto, torna-se preponderante o entendimento do protagonismo das células NK na imunovigilância viral e neoplásica e a identificação de pacientes mais vulneráveis, com fatores adicionais de risco nos estágios iniciais de desenvolvimento da neoplasia do colo uterino.

1.1 JUSTIFICATIVA

Considerando-se que características imunogenéticas individuais podem contribuir para a eliminação ou persistência do HPV no ambiente cervical e consequente desenvolvimento do câncer do colo do útero, assim como, sabendo-se que as células *NK* estão envolvidas na imunovigilância contra infecções virais e na defesa contra o desenvolvimento de processos neoplásicos, o presente estudo se justifica pela necessidade de entendimento do papel do repertório de receptores KIR (*Killer Immunoglobulin like receptor*) no cenário de desenvolvimento desta neoplasia, sobretudo devido à ausência de trabalhos relevantes publicados em população brasileira, visando poder contribuir para a individualização do acompanhamento e tratamento das pacientes, podendo contribuir para um desfecho mais favorável para a vida e saúde da mulher.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Caracterizar os genes *KIR* e avaliar a associação da variação do polimorfismo de “presença e ausência de genes *KIR*” na susceptibilidade à infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) e/ou no grau da lesão em pacientes com lesão precursora do câncer cervical.

1.2.2 Objetivos específicos

- Estimar a frequência (presença/ausência) dos genes *KIR* nos grupos NIC2, NIC3, HPV (+) e HPV (-) individualmente e em grupos comparativos, separados conforme abaixo descrito:
 - presença *versus* ausência de infecção pelo HPV
 - presença *versus* ausência de lesão precursora
 - HPV (+) sem lesão *versus* HPV (-)
 - NIC2 *versus* NIC3.
- Caracterizar e avaliar haplótipos/genótipos nos grupos NIC2, NIC3 e controles HPV (+) e HPV (-).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER CERVICAL

2.1.1 Epidemiologia

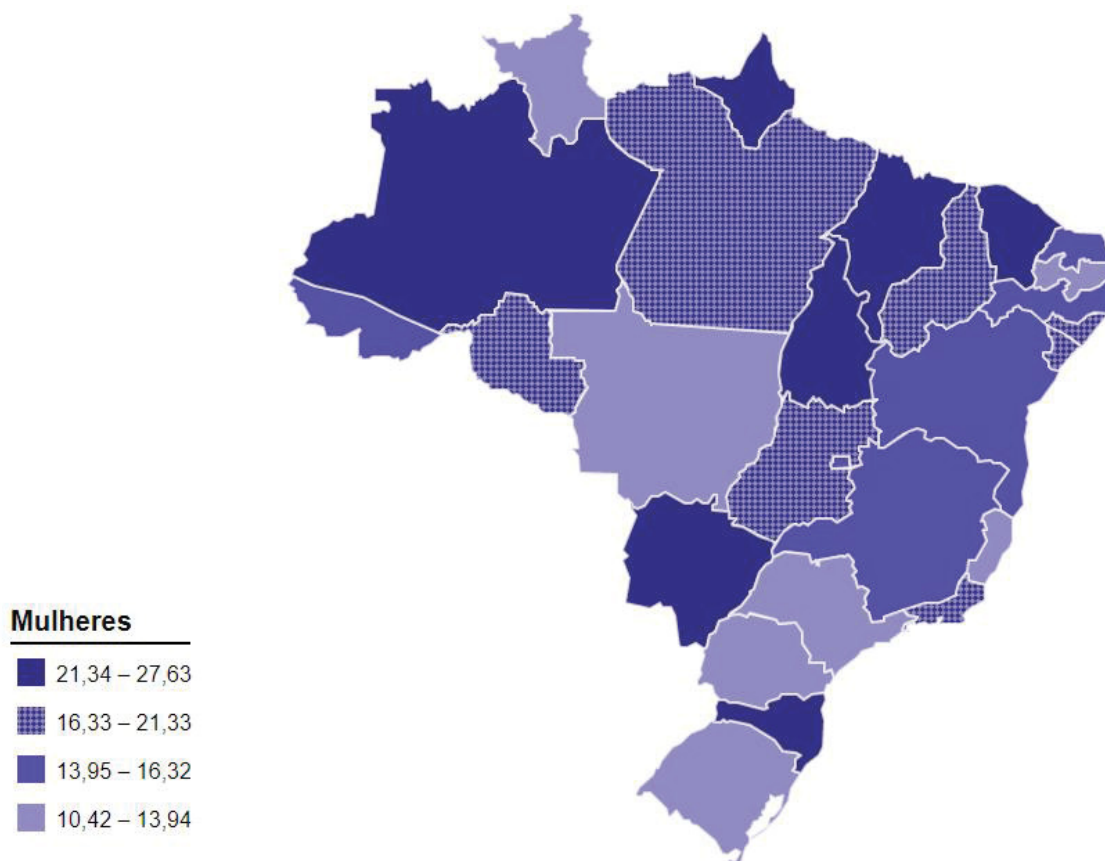
O câncer cervical (CC) está entre as neoplasias de maior prevalência entre as mulheres, especialmente em países com baixos índices socioeconômicos, onde o progresso na redução de sua incidência e mortalidade ocorre lentamente (SINGH *et al.*, 2023). A maioria das mulheres são infectadas pelo HPV logo que iniciam a vida sexual. A maior prevalência da infecção pelo HPV está na faixa etária abaixo dos 25 anos de idade, havendo um decréscimo à medida que há o aumento da idade da população feminina (BOSCH *et al.*, 2013; MAESTRI *et al.*, 2018).

De acordo com dados do Globocan, em 2020 o CC atingiu a quarta colocação entre os casos de câncer e em mortalidade entre mulheres, tendo sido registrados 604.127 novos casos e 341.831 mortes (SUNG *et al.*, 2021).

Nas américas o câncer de colo de útero é a principal causa de morte entre mulheres, sendo responsável por 35,7 mil óbitos, sendo 80% na América Latina e Caribe, cujas populações têm os menores índices de desenvolvimento. Com o crescimento da população e da expectativa de vida, a tendência é que estes índices aumentem ainda mais nos próximos anos (OPAS, 2024).

No Brasil, de acordo com dados divulgados pelo INCA, o câncer cervical como localização primária de tumor têm incidência estimada de 17.000 novos casos por ano, sendo responsável por 7% de todos os casos de câncer em mulheres. Os estados os estados do Amazonas, Amapá, Maranhão, Tocantins, Ceará, Mato Grosso do Sul e Santa Catarina são os estados com estimativas de maiores taxas brutas de incidência por 100.000 mulheres (FIGURA 1) (BRASIL, 2022).

FIGURA 1- REPRESENTAÇÃO ESPACIAL DAS TAXAS BRUTAS DE INCIDÊNCIA DA NEOPLASIA MALIGNA DO COLO DO ÚTERO POR 100 MIL MULHERES, ESTIMADAS PARA O ANO DE 2023.



FONTE: Brasil (2022).

2.1.2 Fatores de risco

A maioria das lesões precursoras do câncer do colo do útero se desenvolvem por um longo período até a entrada na rota da carcinogênese. Felizmente, em cerca de 90% dos casos o sistema imunológico depura as lesões iniciais em até três anos. A infecção crônica, no entanto, permanece em 10% das pacientes e 1% evolui para o câncer cervical (DELIGEOROGLOU *et al.*, 2013).

Infecções persistentes por papilomavirus humano (HPV) oncogênicos são a principal causa para o desenvolvimento do câncer cervical. A presença do HPV é necessária, porém não suficiente. Dentre os genótipos HPV com potencial oncogênico, o HPV 16 sobressai-se como responsável por quase metade dos casos de CC. Juntos, HPV 16 e HPV 18 são responsáveis por cerca de 70% dos casos (GRAU-BEJAR *et al.*, 2023). A presença do HPV oncogênico e características

relacionadas ao hospedeiro, modulam o risco de progressão da doença (DE SANJOSE, BROTONS e PAVON, 2018). Dentre os fatores que contribuem para o desenvolvimento do câncer, estão o comportamento sexual e número de parceiros, idade da primeira relação sexual, tabagismo, o uso prolongado de contraceptivo oral, multiparidade, imunossupressão, infecções com outros patógenos de transmissão sexual e não seguimento de recomendações de *screening* e tratamento (JAISAMRARN *et al.*, 2013).

2.1.3 Prevenção e tratamento

O desenvolvimento do CC se dá a partir de lesões precursoras que podem ficar latentes por muitos anos, muitas vezes sem o aparecimento de sintomatologia, sendo de evolução silenciosa. Neste cenário é de suma importância a detecção das lesões o mais precocemente possível para que se atinja o devido sucesso no tratamento, tanto de lesões precursoras quanto neoplásicas, que porventura já habitem o ambiente cervical (DE SANJOSE, BROTONS e PAVON, 2018).

As medidas preventivas envolvem duas frentes. A prevenção primária, que ocorre através da vacinação profilática para o HPV e a prevenção secundária, através de programas de rastreio de lesões precursoras do câncer, com a citopatologia isoladamente ou associada à genotipagem HPV. Em conjunto, as estratégias de combate ao CC são imprescindíveis na diminuição dos índices desta patologia e da mortalidade a ela relacionada (MINION e TEWARI, 2018; LIU *et al.*, 2019).

De acordo com o INCA, a partir de 2014 foi instituído no Brasil o programa vacinal, que atualmente contempla meninas e meninos. Sua aplicação nos programas de prevenção é recomendada preferencialmente para antes do início da vida sexual e protege contra os sorotipos de alto risco, HPV 16 e 18, responsáveis por 70% dos casos de câncer cervical. Embora efetiva para os genótipos que abrange, a vacina não é efetiva em lesões já existentes e não confere proteção aos genótipos HPV que não são seu alvo (LIU *et al.*, 2019).

Programas de rastreio do CC são essenciais, pois frequentemente os sintomas só aparecem quando a neoplasia já está em fase avançada e a investigação de rotina reduz sua incidência e mortalidade. No Brasil, o programa público de rastreio abrange a faixa etária entre 25 e 64 anos e foi implantado de forma oportunística, tendo efetividade apenas quando a paciente procura pelo serviço de saúde. A

recomendação é que o exame citológico seja realizado anualmente e após dois testes negativos consecutivos, o intervalo poderá ser aumentado para a cada três anos. Mesmo após décadas de sua instituição, sua abrangência apresenta-se ainda ineficiente, com baixo impacto na mortalidade. É fundamental que haja uma organização mais elaborada de rastreio para que se atinja real efetividade no controle da incidência do câncer. Mesmo em áreas mais favorecidas, o rastreio tem demonstrado efetividade limitada, com queda lenta nos índices desta neoplasia (TEIXEIRA *et al.*, 2018; TEIXEIRA *et al.*, 2019). Nos Estados Unidos, a recomendação da Sociedade Americana de Câncer, é que o *screening* para o câncer cervical ocorra a partir dos 25 anos de idade e, quando incluída a testagem para HPV, a cada cinco anos, até o 65 anos de idade. No caso da indisponibilidade de se realizar a testagem para o HPV, recomenda-se fortemente que se realize o exame citológico a cada três anos (FONTHAM *et al.*, 2020).

Na detecção de uma anormalidade no exame citológico, segue-se com a colposcopia e biópsia cervical. Os tratamentos para a neoplasia intraepitelial cervical variam de condutas para destruição do tecido como a vaporização a laser ou a conização, que consiste na remoção de um fragmento do tecido a partir do endocervix até o ectocervix (SÁNCHEZ-SILES *et al.*, 2020). Em fases mais avançadas a quimioterapia baseada em cisplatina é associada à radioterapia (GUTIERREZ-HOYA e SOTO-CRUZ, 2021). Na população jovem, o tratamento assume características adicionais de risco. A necessidade de tratamento cirúrgico, que engloba exérese de uma porção do colo uterino ou a histerectomia, pode implicar em desfechos obstétricos desfavoráveis e impossibilidade de gestar. O manejo das lesões pré-malignas também pode influenciar negativamente em gestações futuras. Em pacientes com diagnóstico tardio e estadiamento mais avançado, as opções terapêuticas são limitadas e o prognóstico é reservado (CHONG *et al.*, 2017; HALLE *et al.*, 2017).

Para que se caminhe no sentido da erradicação do câncer cervical a Organização Mundial de Saúde estabeleceu uma meta mundial a ser atingida até 2030 definida com o alvo 90-70-90, assim descrita: 90% das meninas com programa vacinal completo aos 15 anos de idade, 70% das mulheres submetidas a investigação aos 35 e novamente aos 45 anos e 90% das mulheres com lesões precursoras tratadas e 90% de manejo dos casos de câncer invasivos.

2.1.4 Agente etiológico

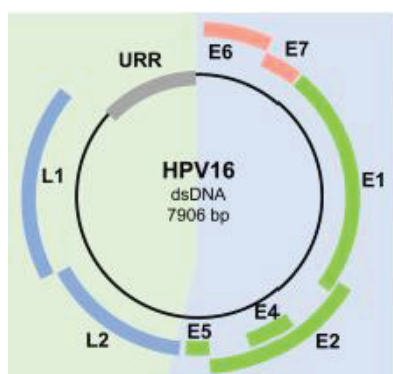
O papilomavirus humano (HPV) é um vírus da família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavirus*, com 50 nm, de dupla hélice de DNA, contendo cerca de oito mil pares de bases, organizados de forma circular em um capsídeo não envelopado (DE VILLIERS *et al.*, 2004). O HPV infecta as células basais do epitélio escamoso. A replicação viral acontece graças à apropriação, pelo vírus, do maquinário da célula infectada. A persistência da infecção pelo HPV contribui diretamente na carcinogênese devido à expressão de oncogenes, ocasionando falhas nos *check-points* do ciclo celular, no controle do metabolismo celular, modulando a resposta imune do hospedeiro, promovendo a iniciação do tumor e sua evolução (ZHOU, TUONG e FRAZER, 2019).

Mais de cento e oitenta genótipos HPV já foram identificados, podendo desencadear lesões mucosas ou cutâneas, sendo classificados em α -papilomavirus, β -papilomavirus ou γ -papilomavirus. O câncer cervical está relacionado ao gênero α -HPV (ZHOU, TUONG e FRAZER, 2019). Os genótipos associados com infecções anogenitais são cerca de quarenta e conforme seu potencial oncogênico, são classificados em genótipos de alto risco (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), genótipos de risco intermediário (HPV 26, 53 e 66) ou genótipos de baixo risco (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81), associados a verrugas genitais e características de normalidade do epitélio. Juntos, os genótipos HPV 16 e HPV 18 respondem por cerca de 70% dos casos de câncer cervical na maioria dos estudos epidemiológicos (SENAPATI, SENAPATI e DWIBEDI, 2016). O HPV 18 é o genótipo mais fortemente associado ao adenocarcinoma de cérvix e o HPV 16, seguido pelo HPV 18 são os mais frequentemente detectados quando o carcinoma de célula escamosa é diagnosticado (WOODMAN, COLLINS e YOUNG, 2007).

O genoma viral é constituído por três porções (FIGURA 2). Uma região não codificadora, envolvida na regulação da replicação viral e transcrição, a *LCR* (“*long control region*”) e duas regiões codificadoras, designadas pelas letras E, do inglês “early” e L, do inglês “late”. Seis genes (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) expressos durante todo o ciclo celular do vírus, regulam as fases vegetativa e produtiva, codificando proteínas envolvidas na replicação, transcrição e transformação celular (SONG *et al.*, 2015). Dois genes (L1 e L2) são responsáveis pelas proteínas do capsídeo e

altamente expressos nas fases mais tardias da infecção viral (ZHOU, TUONG e FRAZER, 2019). Os genes E1 e E2 são necessários para iniciar a replicação viral e são expressos nas camadas intermediárias. A proteína E1 aumenta a replicação viral e E2 diminui a expressão de E6 e E7. As oncoproteínas virais E5, E6 e E7 contribuem para a iniciação do câncer, são responsáveis pela evasão viral, alterando a regulação do ciclo celular e gerando instabilidade genômica. O gene E5 possivelmente está envolvido com a desregulação de expressão das moléculas de histocompatibilidade (HLA) da célula (SONG *et al*, 2015). Genes E6 e E7, são expressas nas células basais e parabasais e induzem a divisão celular no epitélio, facilitando a replicação viral. Envolvidos na integração do *DNA* viral ao genoma do hospedeiro, contribuem para a transformação celular, bloqueando a supressão do tumor e a apoptose celular, ocasionando a imortalização da célula e progressão da doença (DE SANJOSE, BROTONS e PAVON, 2018). Os eventos críticos no desenvolvimento tumoral, envolvem a degradação da proteína p53 promovido pela proteína E6, a indução da expressão de telomerase e a degradação da família de proteínas do retinoblastoma (Rb), promovido pela proteína E7. Com a alteração nas proteínas supressoras de neoplasia – p53 e pRb, os tumores HPV-positivos apresentam maior proliferação celular e perda da estabilidade genômica. E4 promove a interrupção da divisão celular, é expresso nas camadas intermediárias e superiores do epitélio. O capsídeo do vírus é montado com as proteínas L1 e L2 e o genoma viral é incorporado na camada superior do epitélio escamoso (ZHOU, TUONG e FRAZER, 2019).

FIGURA 2 - ESTRUTURA E PROTEÍNAS VIRAIS DO HPV.



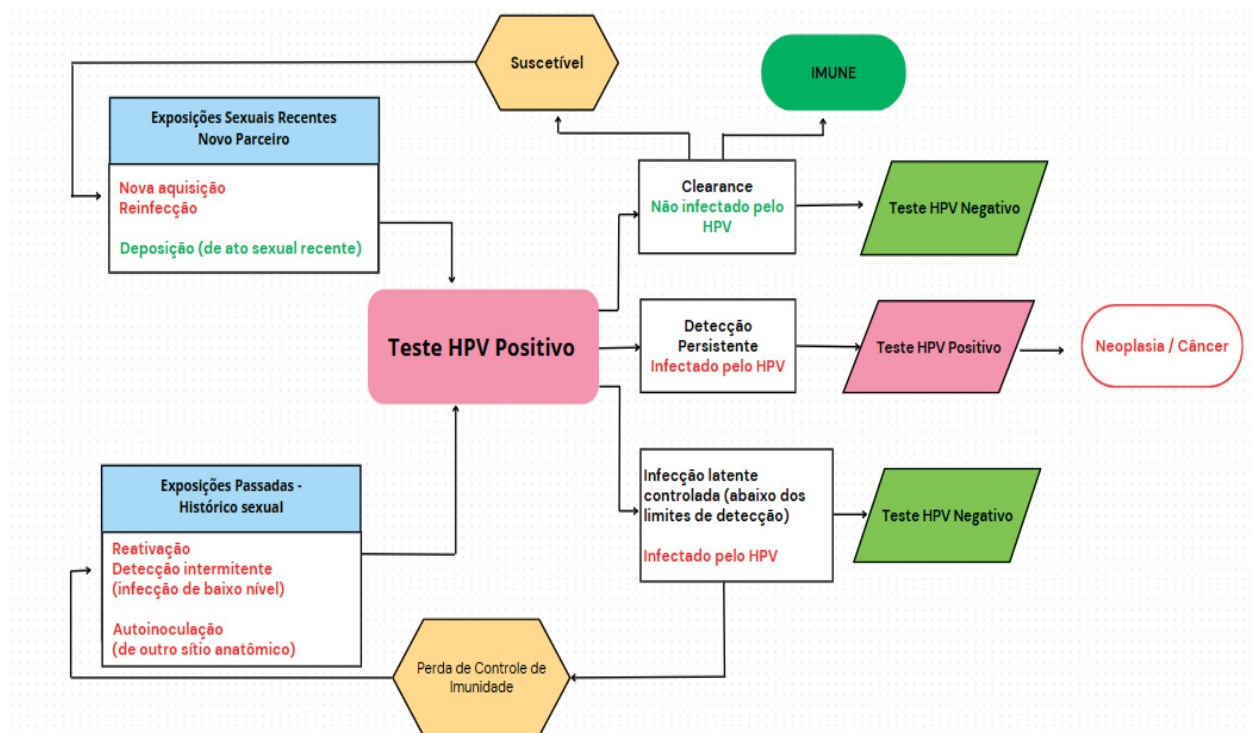
URR: origem da replicação, sítios de ligação para transcrição e controle de expressão gênica, L1: proteína maior do capsídeo, L2: proteína menor do capsídeo, E1: replicação e transcrição viral, E2: replicação viral, apoptose, repressão transcricional de E6/E7, E4: replicação viral, E5: proliferação celular, alterações de sinalização, reconhecimento imune e apoptose, E6: degradação de p53, alteração de regulação do ciclo celular, resistência à apoptose, instabilidade cromossômica e imortalização celular, E7: degradação de pRb, reentrada na fase S do ciclo celular, superexpressão de p16, instabilidade cromossômica

FONTE: De Sanjose, Brotons e Pavon (2018) (Adaptado)

2.1.5 História natural da doença

A infecção persistente pelo HPV é fator fundamental para o desenvolvimento do CC. No entanto, dois testes positivos para o HPV em curto intervalo de tempo não necessariamente têm significado de maior risco para o desenvolvimento do CC e um teste negativo após outro positivo nem sempre reflete a eliminação efetiva do vírus, podendo este estar em nível abaixo do detectável ou em latência (FIGURA 3) (GRAVITT e WINER, 2017).

FIGURA 3 - MODELO ESQUEMÁTICO DA HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO HPV E DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER CERVICAL

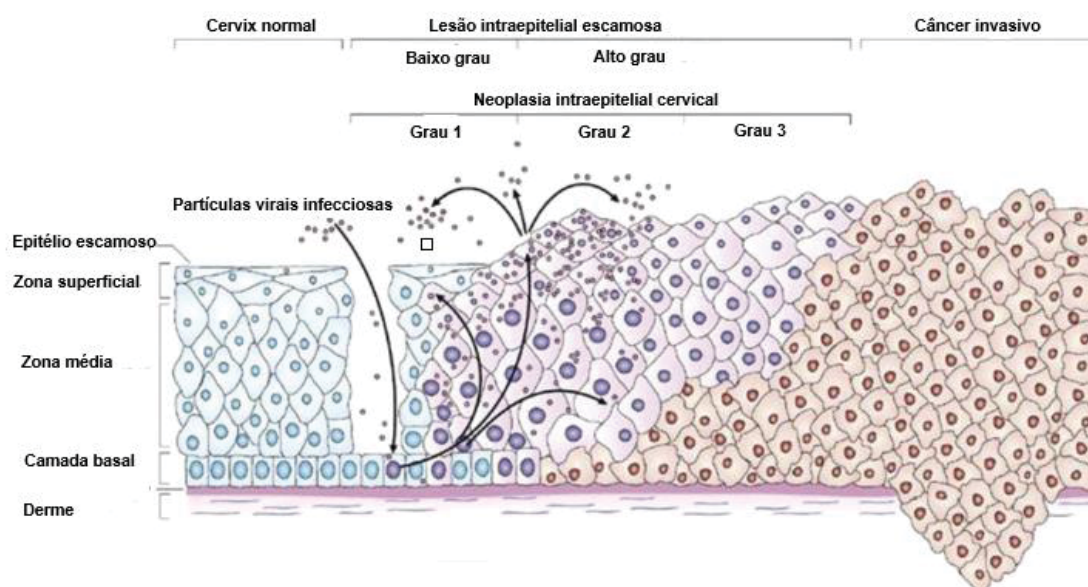


FONTE: Gravitt e Winer (2017) (Adaptado)

A infecção pelo HPV acomete o epitélio escamoso do trato genital feminino, causando lesões intraepiteliais escamosas (SILs – *squamous intraepithelial lesions*). A infecção pelo HPV de alto risco causa inicialmente lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL – *low grade squamous intraepithelial lesion*), lesões pré-cancerosas, também conhecidas como neoplasia intraepitelial cervical de grau I (NIC 1) (BRAATEN e LAUFER, 2008). Estas lesões frequentemente se resolvem sem

necessidade de tratamento, mas devem ser monitoradas, pois podem evoluir para lesões intraepiteliais escamosas de alto grau. Neoplasia intraepitelial de grau II (NIC2) constitui a fase intermediária com displasia moderada e risco de 30 a 40% de progressão para NIC 3 (displasia severa ou carcinoma *in situ*) (DOVNIK e POLJAK, 2023). As lesões de alto grau podem persistir por anos e se não forem tratadas, o risco de evoluírem para o câncer é em torno de 20% nos primeiros 5 anos e 50% em 30 anos (ZHOU, TUONG e FRAZER, 2019). Lesões NIC 2 e 3 são as que têm maior chance de progredir, no entanto, algumas delas regredem, dando a este grupo uma característica heterogênea (FIGURA 4) (DE SANJOSE, BROTONS e PAVON *et al.*, 2018).

FIGURA 4 - PROGRESSÃO DE LESÕES NO EPITÉLIO CERVICAL, MEDIADA PELO PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV).



FONTE: De Sanjose *et al.* (2018)(Adaptado)

LEGENDA: Evolução gradual das lesões a partir do epitélio normal até o tecido todo comprometido na forma de câncer invasivo.

2.2 CÉLULAS NATURAL KILLER: CARACTERÍSTICAS E BIOLOGIA

As células assassinas naturais (*Natural killer cells*) ou células *NK*, foram descritas na década de 1970 quando Herberman e Kiessling em estudos independentes, observaram linfócitos com atividades citotóxicas espontâneas dirigidas a células tumorais (HERBERMAN *et al*, 1975; KIESSLING *et al*, 1975).

As células *NK* são componentes do sistema imune inato e em conjunto com a barreira epitelial, leucócitos fagocíticos e células dendríticas, são fundamentais na

imunovigilância. Diferente do que ocorre na imunidade adaptativa, em que células T citotóxicas são antígeno-específicas, a capacidade efectora das células *NK* ocorre sem necessidade de sensibilização prévia (MURPHY *et al.*, 2010). Quanto a seu efeito citotóxico, possuem similaridade com as células T CD8+. Graças à secreção de perforina e granzimas, células *NK* desencadeiam a ruptura da membrana celular e apoptose da célula alvo (MANDAL e VISWANATHAN, 2015; BAO *et al.*, 2018).

Até 1980 foram chamadas de *null-cells*, por não possuírem receptores de células T ou B (KANNAN, AQUINO-LOPEZ e LEE, 2017). Fenotipicamente, por não possuírem os marcadores de superfície de células T e B, são descritas como CD19/TCR/CD3 negativas. Possuem os marcadores CD56/CD16 e conforme seus respectivos graus de expressão, é possível diferenciá-las quanto ao seu amadurecimento, resposta a estímulos e efeito citotóxico (NAYYAR, CHU e CAIRO, 2019).

O conhecimento acumulado ao longo de mais de 50 anos sobre a biologia e especificidades das células *NK* no reconhecimento de células alvo, foi determinante para que fossem consideradas componentes centrais na imunologia e nas estratégias terapêuticas dirigidas contra doenças neoplásicas e virais (BJÖRKSTRÖM, STRUNZ, & LJUNGGREN, 2022).

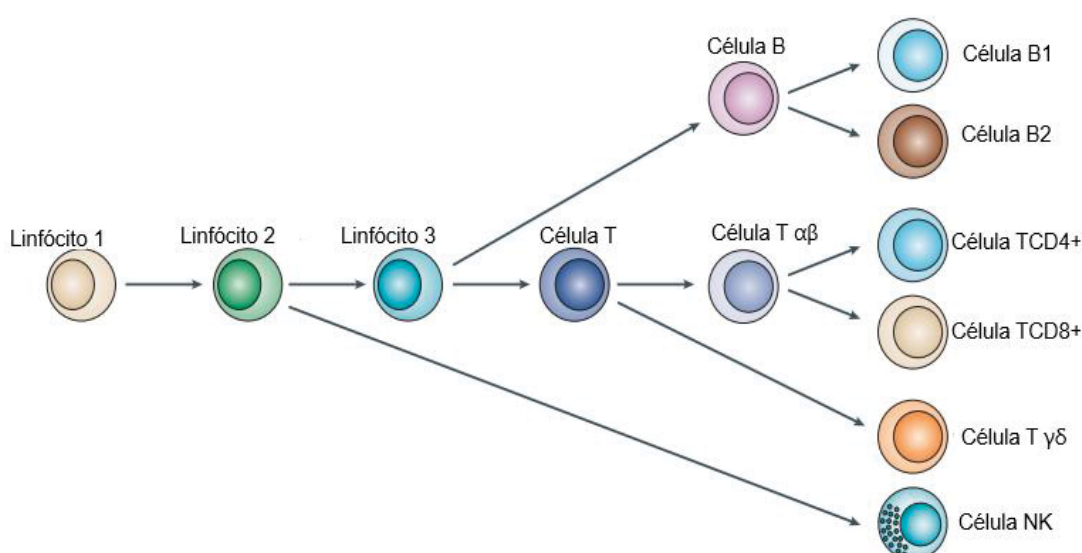
Representando 5 a 25% das células mononucleares sanguíneas de indivíduos saudáveis, as células *NK* são linfócitos granulares grandes, derivados da medula óssea e que evoluem a partir de um progenitor linfóide (FIGURA 5) (PARHAM, 2005; RAJALINGAM, 2018). De acordo com Parham 2005, com relação aos linfócitos T, embora originem-se do mesmo progenitor linfóide, as células *NK* apresentam similaridades àquelas quanto à secreção de citocinas, interação com células dendríticas e na citotoxicidade, porém diferenciam-se delas devido à ausência de receptor de células T (TCR) (PARHAM, 2005).

Para que sejam licenciadas para competência funcional sem, no entanto, terem efeito citotóxico contra antígenos próprios, as células *NK* passam por um processo de educação durante seu desenvolvimento, quando aprendem a ter tolerância ao próprio. Neste processo elas são preparadas para não serem ativadas ao reconhecerem proteínas HLA próprias (PENDE *et al.*, 2019). Diferente da resposta imune desenvolvida por células T, cujo reconhecimento do antígeno estranho ocorre quando este está inserido na fenda da molécula HLA própria, células *NK* têm sua função citotóxica ativada na ausência de moléculas HLA na célula alvo. Linfócitos T e

células NK são braços diferentes e complementares na imunidade celular (REYBURN *et al.*, 1997).

Em condições normais, todas as células nucleadas expressam moléculas HLA de classe I em sua superfície e durante o amadurecimento das células *NK*, ocorre o reconhecimento de proteínas HLA de classe I por receptores KIR inibidores. Na ausência de reconhecimento do próprio (“*Missing-self*”) a célula *NK* tem sua capacidade para matar ativada, processo este chamado de “*licensing*” ou licença para matar, essencial na imunidade inata (BARROW e COLONNA, 2019).

FIGURA 5 - EVOLUÇÃO DAS CÉLULAS *NK* A PARTIR DE UMA CÉLULA PROGENITORA LINFÓIDE COMUM AOS LINFÓCITOS B, T CD4+, T CD8+ E T $\gamma\delta$.



FONTE: Parham (2005)(Adaptado)

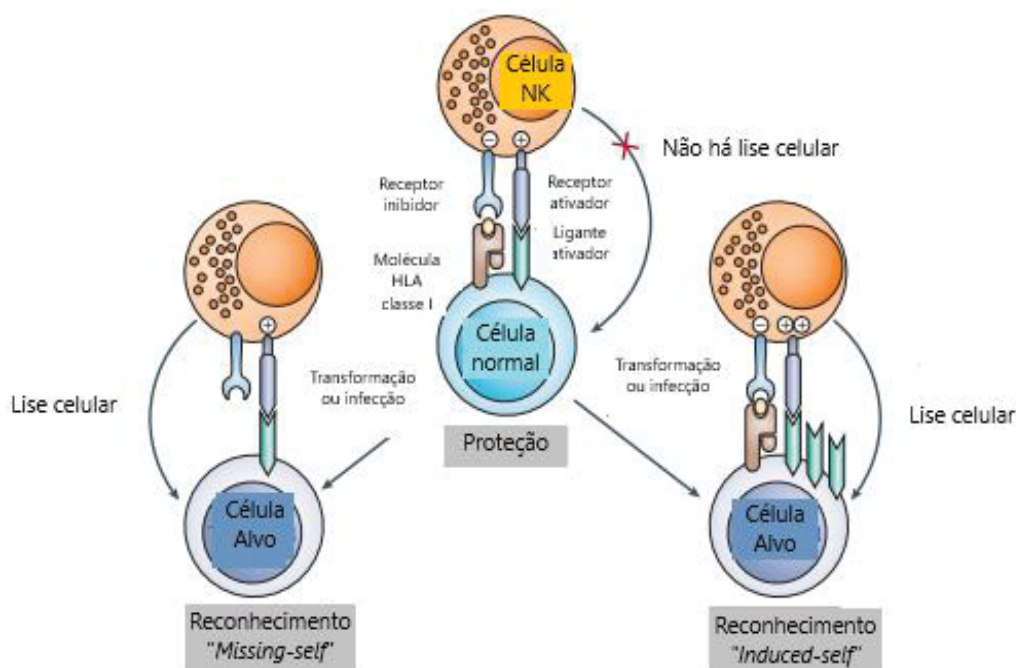
2.2.1 Imunovigilância mediada por células *NK*

Presentes na fase precoce da imunovigilância, as células *NK* são fundamentais na identificação e reação a células infectadas por vírus, células sob efeito de estresse ou em desenvolvimento de processos neoplásicos. Estas células constituem a primeira linha de defesa antiviral o que pode ser constatado pelos vários mecanismos utilizados por vírus para evadir-se da resposta imune mediada por células *NK* (JOST & ALTFELD, 2013).

O reconhecimento e eliminação das células infectadas por vírus, dentre os quais o HPV, por células *NK*, é mediada pela interação de um conjunto de receptores

de inibição e ativação, que irão determinar a destruição das células infectadas. A função efetora das células *NK* ocorre quando há um desequilíbrio em favor dos receptores ativadores, sendo este, um gatilho para a sua ativação. Num contexto de normalidade, há um equilíbrio entre receptores ativadores e inibitórios e seus respectivos ligantes expressos nas células-alvo (RAULET e VANCE, 2006; BARROW e COLONNA, 2019). Na presença de infecção ou no desenvolvimento de processos neoplásicos, a célula-alvo perde a expressão de moléculas HLA, é o “missing-self”. Com a prevalência de sinais ativadores, ocorre a ativação das células *NK* e a consequente lise da célula-alvo (DAVIES *et al.*, 2014; KIM e KIM, 2018). Neste contexto também pode haver uma maior expressão de ligantes para os receptores ativadores de modo que a inibição constitutiva seja superada. Este fenômeno é conhecido como auto-reconhecimento induzido (RAULET e VANCE, 2006) (FIGURA 6).

FIGURA 6 – BASE MOLECULAR DO RECONHECIMENTO “MISSING-SELF” E “INDUCED-SELF” DAS CÉLULAS *NK*.



FONTE: Raulet e Vance (2006) (Adaptado)

LEGENDA: O equilíbrio ou não de sinais inibitórios e estimulatórios recebidos por uma célula assassina determina o resultado das interações com as células-alvo.

Os receptores de membrana que participam da regulação das células *NK* podem ser classificados em cinco famílias principais: a) receptores naturais de

citotoxicidade, estritamente ativadores (NKp46 e NKp44); b) os receptores ativadores ou inibidores semelhantes a lectina tipo C (CD94/NKG2); c) receptores tipo imunoglobulina de células *NK* (*KIR* – *killer cell immunoglobulin-like receptors*); d) receptores de leucócitos semelhantes às imunoglobulinas (LILR); e) CD2, entre outros descritos mais recentemente (RIZZO *et al.*, 2021).

2.2.2. Receptores *KIR*

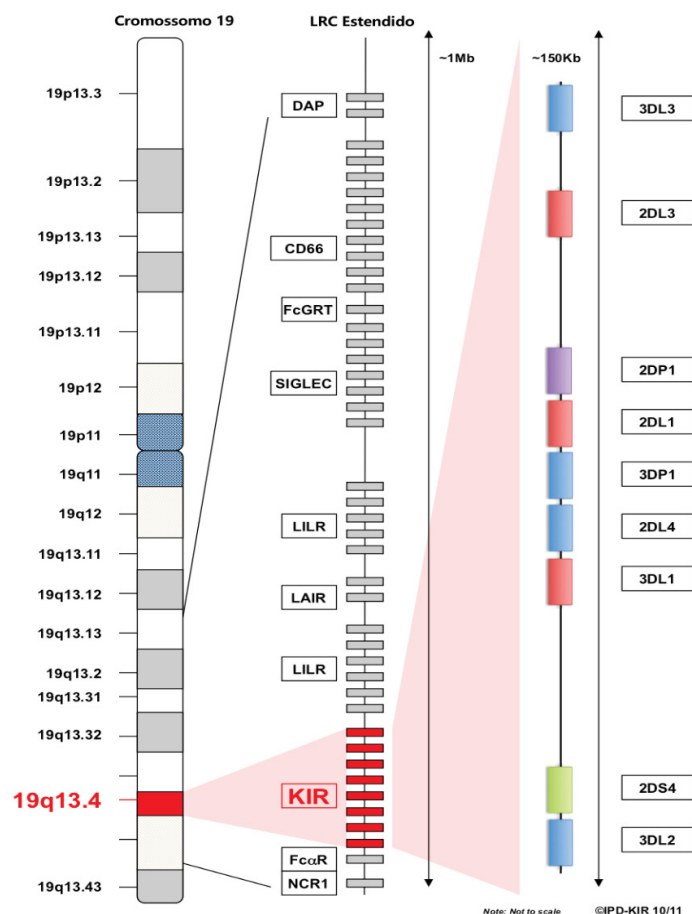
Dentre os receptores de membrana que atuam na regulação da função efetora das células *NK*, os receptores da família *KIR* têm sido os mais estudados. Receptores *KIR* estão expressos em todas as células *NK* e numa minoria de células T, incluindo algumas CD4+, CD8+ e células $\gamma\delta$ (BAO *et al.*, 2018).

Os receptores *KIR* são codificados pela família de genes *KIR*. O repertório *KIR* de um indivíduo é formado pela herança proveniente de seus genitores. Os genes presentes em cada um dos cromossomos são herdados em uma unidade denominada haplótipo. Na composição de um haplótipo *KIR* combinam-se diferentes genes e suas variações alélicas, determinando um repertório *KIR* extremamente individualizado e diversificado (VOLTARELLI *et al.*, 2009). Este complexo gênico apresenta polimorfismo incomum. Sua diversidade é determinada pelo polimorfismo de presença e ausência, possibilitando a existência de haplótipos com diferentes conteúdos gênicos. O repertório *KIR* de um indivíduo é altamente individualizado e determinado portanto, pela combinação de genes presentes em seus cromossomos, suas variações alélicas e a combinação dos haplótipos provenientes de seus genitores (UHRBERG, PARHAM & WERNET, 2002). Os genótipos *KIR* variam ainda conforme sua ascendência étnica, o que contribui ainda mais para a dificuldade em se encontrar indivíduos idênticos entre grupos geneticamente não relacionados (TONEVA *et al.*, 2001; UHRBERG, PARHAM & WERNET, 2002).

De acordo com Kulkarni, Martin e Carrington, 2008, a família gênica *KIR* está situada no cromossomo 19 (19q13.4) e faz parte de um complexo gênico maior denominado Complexo de Receptores Leucocitários (LRC do inglês: *Leucocyte Receptor Complex*). A família de receptores *KIR* é composta por 14 genes (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DS1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*) e dois pseudogenes (*KIR2DP1* e *KIR3DP1*) codificados em uma região de 100-200 Kb na região do LRC. Os genes que

compõem os haplótipos *KIR* estão organizados em duas regiões cromossômicas flanqueadas por 4 genes de moldura que, em raras exceções, estão presentes na grande maioria dos indivíduos. Os genes *KIR3DL3* e *KIR3DL2* definem os finais centromérico e telomérico dos haplótipos, enquanto os genes *KIR3DP1* e *KIR2DL4* estão em localização central. Nas duas regiões intermediárias a estes quatro genes, localizam-se os demais (FIGURAS 7 e 8) (KULKARNI, MARTIN e CARRINGTON, 2008).

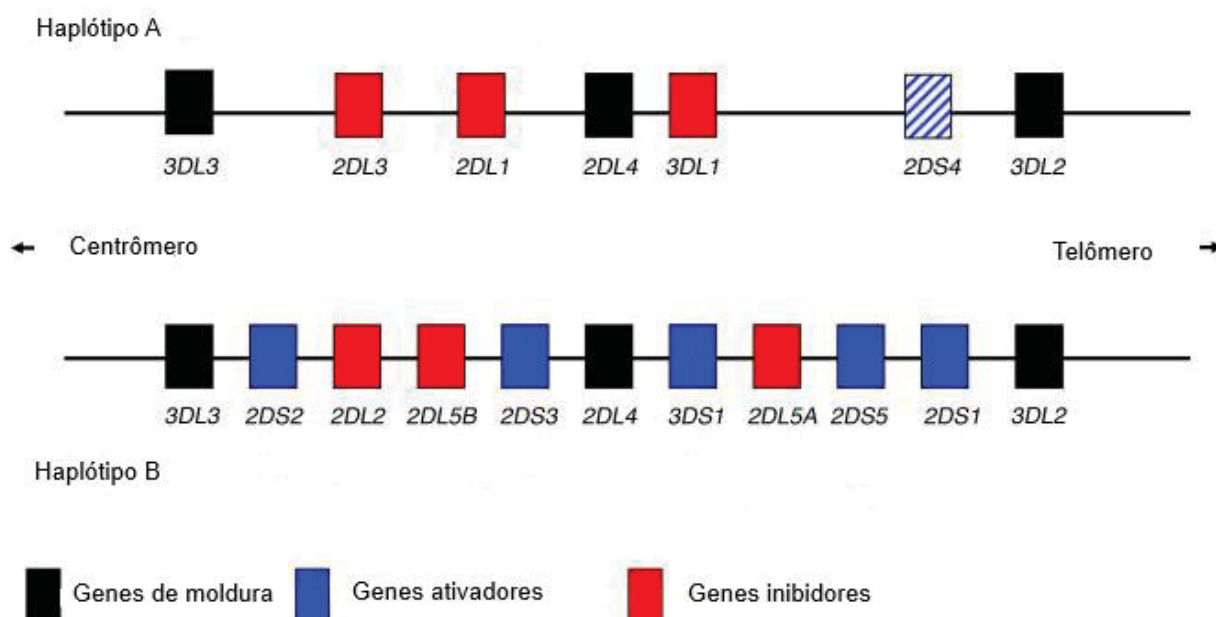
FIGURA 7 – LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DOS GENES *KIR* DENTRO DO COMPLEXO DE RECEPTORES DE LEUCÓCITOS (LRC)



FONTE: Robinson *et al* (2020)(Adaptado)

Complexo Receptor de Leucócitos (LRC) estendido (19q13.4): genes *KIR* e genes que codificam proteínas adaptadoras de DAP, antígenos CD66, bem como receptores SIGLEC, FcGRT, LILR, LAIR, FcαR e NCR1. Um haplótipo *KIR* prototípico do grupo A é mostrado na parte direita da figura. Em azul os genes de moldura, em roxo os pseudogenes (*KIR3DP1* também é um gene de moldura), em vermelho os genes *KIR* inibitórios e em verde representado o gene *KIR* ativador..

FIGURA 8 - DETERMINAÇÃO DE HAPLÓTIPOS *KIR* COM DIFERENTES COMBINAÇÕES DE GENES.



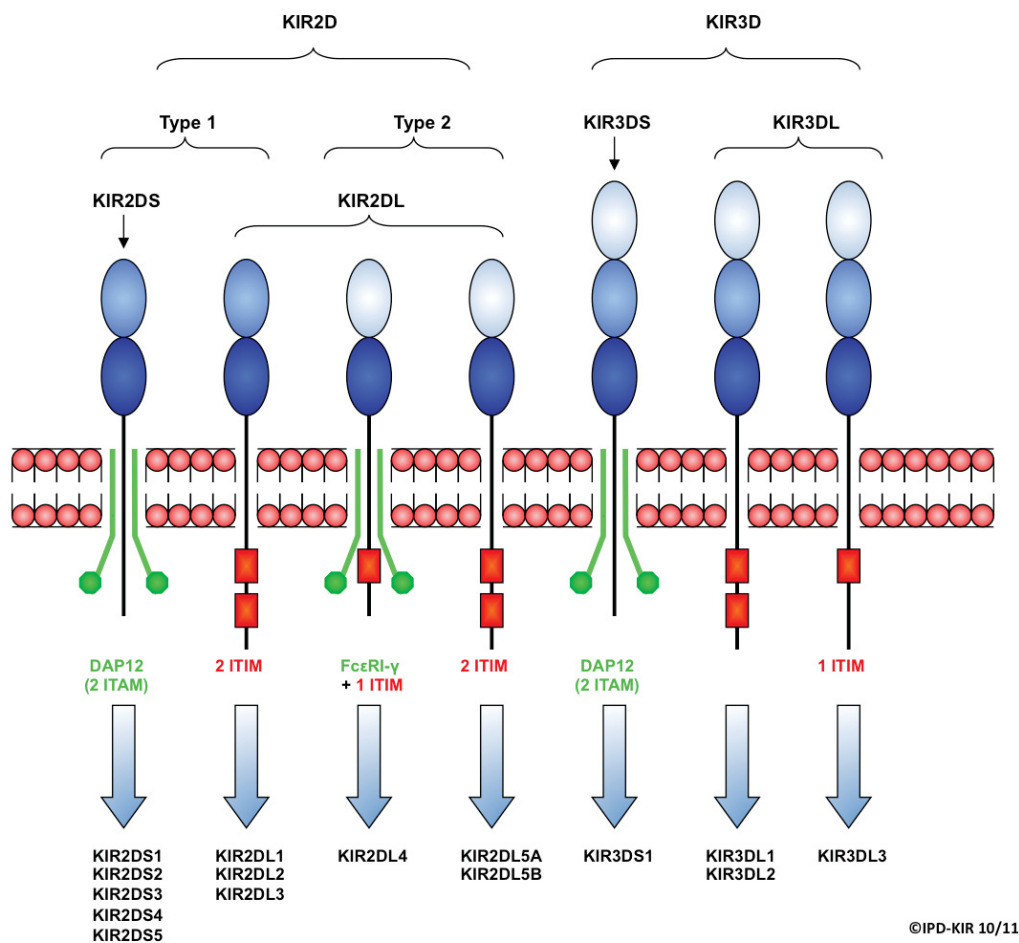
LEGENDA: Haplótipos *KIR* A, contendo predominantemente genes inibidores e haplótipos *KIR* B com maior diversidade de combinação de genes inibidores e ativadores.

FONTE: Hiby *et al.* (2010) (Adaptado)

A nomenclatura dos receptores KIR é baseada em suas características estruturais, podendo conter 2 ou 3 domínios (D, do inglês *domain*) extracelulares que estão envolvidos na interação com seu ligante, uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática longa ou curta (L ou S, do inglês *long* ou *short*) (ROBINSON *et al.*, 2020). Caudas longas contêm uma ou duas cópias de imunorreceptores de inibição baseados em tirosina (ITIMs) que se tornam fosforilados na interação com moléculas HLA de classe I levando à mudança de resposta das células NK. Receptores KIR ativadores não contêm ITIMs, mas contêm resíduos de aminoácidos carregados positivamente na região transmembrana, o que permite a interação com DAP-12, que contém imunorreceptores ativadores baseado em tirosina, que desencadeia sinais ativadores (RAJALINGAM, 2018). Usualmente, moléculas de cauda curta promovem sinais ativadores e de cauda longa, sinais inibidores (PARHAM, 2005). O receptor KIR2DL4 é uma exceção, pois possui cauda longa, característica inibitória, mas na região transmembrana possui um resíduo de aminoácido carregado positivamente, característica esta, ativadora (RAJAGOPALAN,

FU e LONG, 2001). Quando dois ou mais genes têm estruturas e sequências muito similares, eles têm o mesmo número, mas são distinguidos por uma letra final, como ocorre com os genes *KIR2DL5A* e *KIR2DL5B*. Sua similaridade sugere que estão relacionados a um evento recente de duplicação gênica (PURDY e CAMPBELL, 2009) (FIGURA 9).

FIGURA 9 - ESTRUTURA PROTEICA DOS RECEPTORES *KIR*.



FONTE: Robinson *et al* (2020).

LEGENDA: Estruturas proteicas de proteínas *KIR* com dois ou três domínios extracelulares. Associação de *KIR* ativadores a moléculas adaptadoras em verde, enquanto ITIM dos receptores inibitórios em vermelho.

2.2.3. Antígenos leucocitários humanos (HLA): ligantes de receptores *KIR*

A função das células *NK* é dependente da interação de seus receptores com ligantes presentes nas células-alvo. Moléculas HLA de classe I são ligantes de receptores *KIR* e atuam na modulação de resposta das células *NK*.

O sistema HLA é o de maior diversidade no genoma humano e associado à

diversidade dos genes *KIR*, contribui para uma infinidade de possíveis interações, conferindo a cada indivíduo uma diversidade imunológica única (BOUDREAU e HSU, 2018).

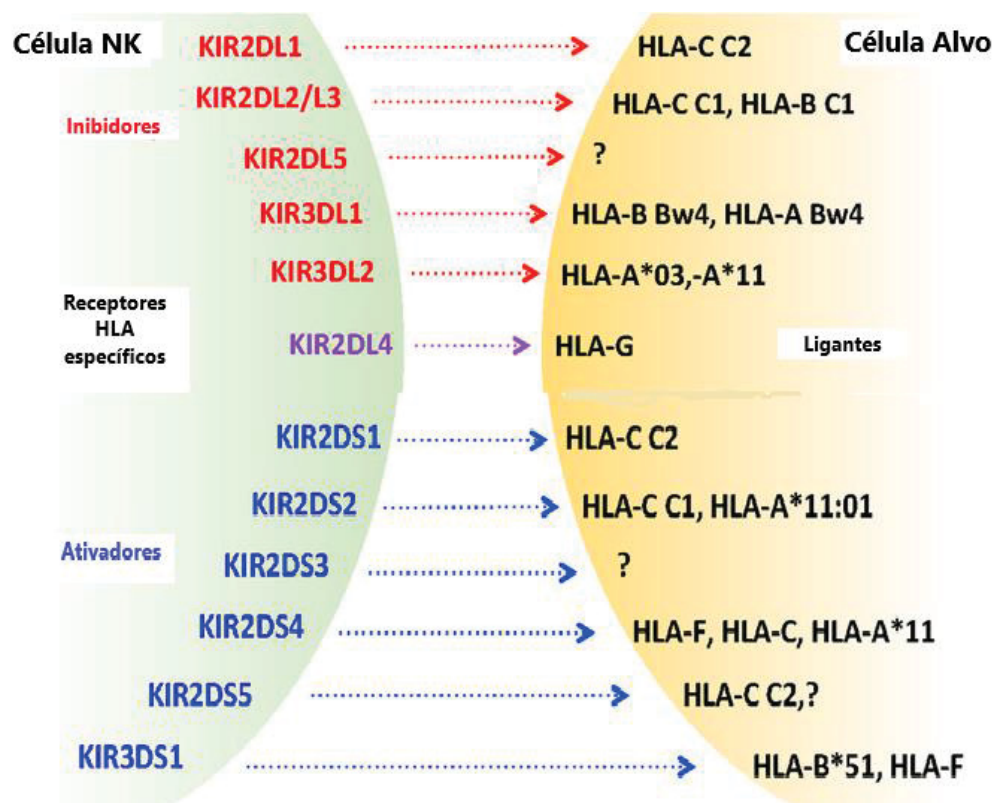
As moléculas HLA são glicoproteínas formadas por duas cadeias polipeptídicas e classificadas em moléculas de classe I e de classe II. As moléculas HLA de classe I são formadas por uma cadeia leve β 2-microglobulina, cuja informação gênica se encontra no cromossoma 15 e por uma cadeia pesada α , cujos genes estão localizados no Sistema HLA, localizado no Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH), no braço curto do cromossoma 6. A cadeia pesada é formada pelos domínios α 1 e α 2, que formam a fenda de ligação ao peptídeo, o domínio α 3, a região transmembrana e a cauda citoplasmática. As moléculas HLA de classe II são formadas por duas cadeias polipeptídicas designadas de α e β , contendo dois domínios extracelulares que formam a fenda de ligação ao peptídeo (α 1 e β 1), os domínios α 2 e β 2, a região transmembrana e a calda citoplasmática (KLEIN e SATO, 2000). Os genes que codificam as moléculas HLA de classe I clássicas (HLA-A, B e C) e as moléculas HLA de classe I não clássicas (HLA-E, F e G) estão localizados na região mais próxima ao telômero. Na região HLA de classe II, mais próxima ao centrômero, estão os genes de classe II, organizados em sub-regiões DR, DQ e DP, que contêm os genes da cadeia alfa e da cadeia beta das moléculas de classe II (KLEIN e SATO, 2000; VOLTARELLI, 2009).

As moléculas HLA de classe I estão expressas na maioria das células nucleadas do organismo e apresentam peptídeos derivados de antígenos intracelulares contendo de 8 a 10 aminoácidos a células T CD8+ cuja interação se faz através de seu receptor de membrana (TCR). As moléculas HLA de classe II restringem sua expressão às células envolvidas na resposta imune, como linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans e apresentam derivados extracelulares endocitados, como bactérias, que são apresentados aos linfócitos T CD4+ (BAO *et al*, 2018).

Apesar da principal função das moléculas HLA de classe I ser a apresentação de antígenos para as células T, elas também são ligantes dos receptores KIR. Moléculas HLA-C são agrupadas em duas categorias, de acordo com a sequência de aminoácidos do epítipo ligante, no resíduo 80: HLA-C1 contém um resíduo de asparagina e são ligantes para receptores inibitórios KIR2DL2, KIR2DL3 e KIR2DS2. Moléculas HLA-C2 possuem um resíduo de lisina na posição 80 e são ligantes de

KIR2DL1 e KIR2DS1. Ligantes para os receptores KIR2DS3 e KIR2DL5 ainda não são conhecidos (QUATRINI *et al.*, 2021; MAO *et al.*, 2022). Ligantes para receptores KIR3DL1 são moléculas HLA designadas como pertencentes ao grupo sorológico contendo o epítipo público Bw4 (HLA-A ou HLA-B), que difere do grupo designado Bw6 na região entre os resíduos de aminoácidos 77 e 83 da cadeia pesada (GUMPERZ *et al.*, 1995; BAO, 2018; MAO *et al.*, 2022). Motivos Bw4 ainda podem ser divididos em alotipos com isoleucina ou treonina na posição 80, o que exibe uma afinidade maior ou menor para KIR3DL1. Os genes *KIR2DL2/KIR2DL3* segregam como alelos do mesmo gene e reporta-se que o gene *KIR2DL2* tem maior afinidade de ligação com alguns alotipos HLA-C1, tendo portanto maior poder inibitório comparativamente a *KIR2DL3*. KIR3DL2 é somente capaz de reconhecer HLA-A3 e HLA-A11 (PURDY E CAMPBELL, 2009; QUATRINI *et al.*, 2021) (FIGURA 10).

FIGURA 10. RECEPTORES KIR E SEUS LIGANTES



FONTE: Quatrini *et al.* (2021)(Adaptado)

LEGENDA: Receptores KIR e seus respectivos ligantes

2.3 RECEPTORES *KIR* E O CÂNCER CERVICAL

Diversos estudos sugerem associação de receptores *KIR* com a proteção ou suscetibilidade a diferentes diagnósticos, incluindo doenças infectocontagiosas, autoimunes e neoplasia (GUILLEREY *et al.*, 2016; BOUDREAU e HSU, 2018). No que se refere ao câncer cervical, no entanto, poucos são os trabalhos desenvolvidos relativos à sua associação com receptores *KIR*. As primeiras pesquisas neste sentido foram publicadas no ano de 2005. Carrington e colaboradores, trabalhando com população do leste dos Estados Unidos e Costa Rica, observou relação de presença de ligantes HLA (HLA-C2 e HLA-Bw4) com receptores *KIR* inibidores (*KIR2DL1* e *KIR3DL1*). Na presença destes ligantes, observou-se diminuição de risco de desenvolvimento de câncer cervical, principalmente quando ambos os ligantes estavam presentes juntos. Na presença de ligante HLA-C1 e ausência de ligantes HLA-C2 e HLA-Bw4 foi observado aumento de suscetibilidade, levantando-se então a hipótese de haver relação entre *KIR* ativadores com suscetibilidade à doença e possível relação com a patogênese do CC. Análises relativas à frequência dos genes *KIR*, demonstraram maiores frequências dos genes *KIR2DS1*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1* em casos (CIN3/CC) do que nos controles ($p = 0,06$; $p = 0,07$ e $p = 0,009$ /OR = 1,64 respectivamente), sugerindo-se relação de aumento de risco especialmente quando receptores inibidores protetivos não estavam presentes (CARRINGTON *et al.*, 2005).

Em sentido contrário, em estudo publicado por Arnheim *et al.* em 2005, ao avaliar relação entre genes e genótipos *KIR* e carcinogênese cervical em população sueca, observou-se relação de genótipo inibidor com aumento de risco de NIC e nenhuma relação do número de genes ativadores e desenvolvimento de lesão intraepitelial cervical. Além disto, neste mesmo estudo o alelo *KIR2DL5B*002* apresentou frequência significativamente maior ($p = 0,003$ /OR = 0,5) em controles saudáveis do que em casos de NIC, sugerindo associação inversa com o desenvolvimento da doença. Não se encontrou associação do número de genes ativadores e o desenvolvimento desta neoplasia (ARNHEIM *et al.*, 2005).

Estudo australiano publicado em 2013 por Brestovac *et al.* avaliou relação de infecção pelo HPV, lesões de alto grau e receptores *KIR*. Neste estudo não se encontrou diferença estatística entre genes *KIR* e mulheres com infecção por HPV 16 e 18 ou com genótipos HPV não 16 ou 18. Também não se encontrou diferença quanto

ao número de genes *KIR* ativadores ou inibidores comparando-se casos e controles. Apenas os genes *KIR2DL2* e *KIR2DS2* apresentaram fraca correlação protetiva para lesões intraepiteliais cervicais de alto grau. Nenhum gene *KIR* apresentou forte associação com lesões precursoras de alto grau (BRESTOVAC *et al*, 2013).

Marangon e colaboradores, publicaram estudo de genes envolvidos na resposta imune e desenvolvimento de doença cervical relacionada ao HPV (MARANGON *et al*, 2013) e Zhang e colaboradores estudando a distribuição e *status* funcional das células *NK* em tecido cervical infectado por HPV 16 e 18 sugeriram que embora o número de células *NK* estivesse aumentado, sua função efetora estava diminuída em tumores causados por HPV16 (ZHANG *et al.*, 2019).

Em 2014 foi publicado artigo de Rizzo *et al*. Sua pesquisa investigava relação de ligantes HLA-C e alelos *KIR* com HPV e lesões cervicais. Neste estudo identificou-se haver relação de risco aumentado de infecção pelo HPV quando da presença de ligantes HLA-C2 e nas infecções por HPV alto risco encontrou-se relação com homozigose de ligantes HLA-C1. Encontrou-se maior frequência de HLA-C1/*KIR2DL2* e HLA-C1/*KIR2DL3* nas pacientes com HPV de alto risco e carcinoma cervical invasivo, comparativamente a pacientes com condiloma (OR = 1,33 e 3,68 respectivamente). Deste trabalho concluiu-se que interação de ligantes HLA-C1 e gene *KIR2DL2* e HLA-C1 e *KIR2DL3* levam à inibição de resposta de células *NK* para a infecção pelo HPV contribuindo para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (RIZZO *et al*, 2014).

Após longo período sem publicação nesta área, em 2022, Tembhurne *et al*. estudando mulheres naturais da Índia, demonstraram que o gene *KIR2DS5* estava com frequência significativamente aumentada em mulheres com câncer cervical comparativamente a mulheres HPV positivas ($p = 0,02$ /OR = 2,42) e controles saudáveis ($p = 0,01$; OR = 2,34), enquanto a frequência de *KIR2DL5B* estava aumentado em controles saudáveis comparativamente a mulheres HPV positivas ($p = 0,02$ /OR = 0,36) e *KIR2DL1* apresentou-se aumentado nos controles saudáveis comparativamente aos casos com câncer cervical ($p = 0,01$ /OR = 0,1). Neste mesmo estudo foi reportado pela primeira vez frequência significativamente alta de gene *KIR2DL1* em controles saudáveis, indicando sua possível proteção contra o câncer cervical. Ainda, foi observado frequência significativamente alta de gene *KIR2DL3* em mulheres infectadas pelo HPV ($p = 0,04$ /OR = 0,35) comparativamente a mulheres com câncer cervical, o que deve ser um biomarcador para infecções virais

(TEMBHURNE *et al*, 2022).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo faz parte de um projeto maior denominado “Polimorfismos genéticos e expressão de genes relacionados ao sistema imune e ao ciclo celular no carcinoma uterino associado à infecção pelo papilomavírus humano”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner sob número de protocolo: P.PNº1943. Todas as mulheres leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo I) e responderam a um questionário epidemiológico (anexo II).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

3.2.1 Critérios de inclusão

Grupo-caso: ter entre 15 e 47 anos de idade, possuir diagnóstico histológico de NIC 2 ou 3 após procedimento cirúrgico (Cirurgia de alta frequência – CAF ou Conização).

Grupo-controle: ter entre 15 e 47 anos de idade, ter realizado exame citológico no dia da entrevista, ausência de lesão cervical.

3.2.2 Critérios de exclusão

Presença de gravidez e imunossupressão.

Conforme descrito na tabela 1, foi selecionada uma amostragem randomizada de pacientes e controles composta por 447 mulheres, sendo assim classificadas:

- Pacientes (NIC2 e NIC3) - Hospital Erasto Gaertner (HEG), Curitiba – PR
 - diagnóstico: biópsia/cirurgia de alta frequência (CAF)
 - indicação de tratamento cirúrgico para NIC de alto grau
 - NIC 2 → n= 90
 - NIC 3 → n= 94
- Controles HPV positivo – Secretaria de Saúde/ Campo Largo – PR

Citologia cervical normal/Captura Híbrida/genotipagem por PCR-multiplex
HPV (+) → n= 70

- Controles HPV negativo - Secretaria de Saúde/ Campo Largo – PR

Citologia cervical normal/ Captura Híbrida

HPV (-) → n= 193

As etapas de: coleta de material biológico, entrevista para obtenção de dados epidemiológicos, extração de DNA, detecção e genotipagem HPV foram realizadas anteriormente, como parte do trabalho desenvolvido para a tese de doutorado “Carcinoma cervical e suas lesões precursoras: fatores epidemiológicos e o papel dos genes MICA, NKG2D, HLA-B e HLA-DRB1 na oncogênese do câncer (DE FRANÇA, 2012). A detecção de HR-HPV (tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) foi realizada a partir de amostras de DNA isoladas de esfregaço cervical e submetidas a técnica de Captura Híbrida, com auxílio do kit *Digene HC2 High-Risk HPV DNA Test* (Digene). Amostras HPV positivas foram genotipadas por PCR-multiplex, para detectar os sete tipos de HPV oncogênicos de maior prevalência associados ao CCU no Brasil: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45 e 52. Amostras positivas para detecção de HPV, mas negativas para a genotipagem por PCR foram testadas novamente para confirmação dos resultados, pelo método de hibridização reversa utilizando o kit comercial *Digene HPV Genotyping RH* (Qiagen) (GILLIO-TOS *et al.*, 2012).

3.3 CONTROLE DE QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE DNA

As amostras previamente congeladas e disponíveis passaram por avaliação de qualidade para que pudessem ser utilizadas. Concentração e pureza foram medidas por leitura de densidade ótica utilizando espectrofotômetro NanoDrop 2000. O DNA extraído previamente a partir de amostras de sangue por *salting-out* teve sua concentração ajustada para 20 ng/uL, quando possível. Casos em que não foi possível, aceitou-se concentrações acima de 5 ng/uL, conforme especificação da técnica de genotipagem utilizada.

3.4 GENOTIPAGEM DE GENES *KIR*

A técnica de genotipagem *KIR* utilizada baseia-se em amplificação multiplex utilizando pares de *primers* sequências específicas (*PCR-SSP*), seguida da análise de curva de dissociação (“*melting curve*”) dos fragmentos amplificados (AMORIM *et al*, 2018).

O preparo das amostras, preparo da *PCR* e avaliação dos resultados foram realizados no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da UFPR (LIGH). As *PCRs* ocorreram nas dependências do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO) da UFPR com utilização do *ViiA 7 real-time PCR system* quando utilizadas placas de 384 poços (16 amostras por placa) ou *qPCR_7500* para as placas de 96 poços (4 amostras por placa).

Para a validação da metodologia foram utilizadas 16 amostras, sendo 8 delas com resultados conhecidos e obtidos por *PCR-SSO* e 8 com resultados de *PCR-SSP* com subsequente análise de curva de dissociação, de acordo com Amorim *et al*. As amostras utilizadas foram fornecidas pelo Laboratório LIGH e por Amorim *et al*, 2018, respectivamente. Todos os resultados encontrados tiveram concordância com resultados prévios registrados para as referidas amostras.

Os oligonucleotídeos *Invitrogen by Thermo Fisher Scientific* fornecidos liofilizados por Induslab Comércio de Produtos para Laboratório a 25nM foram ressuspensos em água ultrapura conforme recomendado (genes *KIR* a 200 uM e *GALC* a 100 uM). As combinações de *primers* foram preparadas para as 24 reações e mantidos em alíquotas congeladas para facilitar o uso e manter sua integridade. Os *mixes* das *PCRs* foram preparados no momento do uso, conforme a placa a ser utilizada, contemplando 4 ou 16 amostras por placa.

Conforme especificação técnica, o controle de qualidade dos resultados encontrados é baseado na comparação dos picos das curvas de dissociação com diferentes pares de *primers* para o mesmo gene *KIR* e avaliação do controle interno de amplificação. Quando possível, dois genes diferentes são amplificados juntos na mesma reação, sendo um deles de alta frequência e funcionando como controle interno. Em casos onde esta estratégia não é possível, o controle interno de amplificação utilizado foi o gene galactosylceramidase (*GALC*), localizado no cromossoma 14q31.3. Pelo menos dois pares de *primers* foram usados para verificar a presença ou ausência de cada gene *KIR*, exceto para genes *KIR2DS1*, *KIR3DL3* e

para o pseudogene *KIR3DP1*. A homologia do *KIR2DS1* com outros genes *KIR* e sequência similar em particular com gene *KIR2DL1* torna difícil o desenho de um segundo par de *primers* que seja específico. No entanto, o par de *primers* usado é altamente específico e amplifica todos os alelos reportados. Ausência de *KIR3DL3* ou *KIR3DP1* não é frequente e é observado em somente poucos indivíduos conforme *Allele Frequency Database* (GONZALEZ-GALARZA *et al*, 2020). Com relação ao gene *KIR2DS4*, sua presença é avaliada com três diferentes reações. Um par de *primers* amplifica todos os possíveis genes *KIR2DS4*. Alelos do gene *KIR2DS4* são então diferenciados em duas novas amplificações, podendo-se observar a presença do gene *KIR2DS4full* ou do *KIR2DS4del*, quando da deleção de 22 pares de bases.

A análise dos picos das curvas de dissociação é realizada baseando-se em parâmetros pré-estabelecidos e exportados do *software QuantStudio Real-Time PCR* (ThermoFisher Scientific). A interpretação das 24 reações para cada uma das amostras foi realizada manualmente analisando-se os picos presentes em cada reação, conforme consta do suplemento de Amorim *et al.*, 2018.

3.5 ANÁLISE DE DADOS

Para avaliar a influência individual de cada gene *KIR*, de cada haplótipo/genótipo no risco de infecção pelo vírus HPV, foram feitas análises comparativas entre: a) mulheres infectadas pelo HPV com ou sem lesão precursora do CC [NIC2, NIC3, HPV (+)] e mulheres não infectadas pelo HPV [HPV(-)] e b) mulheres infectadas pelo HPV sem lesão precursora [HPV(+)] e mulheres não infectadas pelo HPV [HPV(-)].

Para avaliar a influência individual de cada gene *KIR*, de cada haplótipo/genótipo no desenvolvimento da lesão precursora do CC, foram feitas análises comparativas entre mulheres com lesões intraepiteliais cervicais (NIC2 e NIC3) *versus* mulheres HPV+ sem lesão.

Para avaliar a influência individual de cada gene *KIR*, de cada haplótipo/genótipo na evolução do grau da lesão precursora do CC, foram feitas análises comparativas entre mulheres com lesões intraepiteliais cervicais (NIC2 e NIC3).

Nas análises comparativas, os genes de moldura (*KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e *KIR3DP1*) foram excluídos devido ao fato de estarem presentes em todas

as amostras. Da mesma maneira, o pseudogene *KIR2DP1*, que não faz parte dos genes de moldura, também não foi considerado por não ser considerado funcional.

De acordo com *Allele Frequency Net Database*, qualquer indivíduo que possui em seu repertório os genes *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1* e *KIR2DS4* é categorizado como portador do haplótipo A. Por outro lado, qualquer indivíduo que possui em seu repertório *KIR* os genes *KIR2DL2*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1* é categorizado como portador do haplótipo B. Aquele indivíduo que não apresentar qualquer um dos genes característicos do haplótipo B será considerado como possuindo genótipo homozigoto A/A. Os indivíduos que só possuem genes *KIR* característicos do haplótipo B serão considerados homozigotos B/B, enquanto aqueles portadores dos haplótipos A e B são considerados como heterozigotos (A/B). O atual sistema AFND não faz distinção entre os genótipos A/B e B/B sendo designados como tendo genótipo B/x (GONZALEZ-GALARZA *et al*, 2020).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A frequência de presença ou ausência de cada gene *KIR* foi calculada por contagem direta (frequência do portador ou f_P) e baseando-se neste dado, foram identificados os genótipos.

As frequências gênicas foram estimadas pela fórmula de Bernstein: Frequência gênica (f_G) = $1 - \sqrt{1 - f_P}$ sendo f_P a frequência observada do gene nos grupos investigados. A fórmula de Bernstein assume que as frequências seguem as proporções de Hardy-Weinberg (BERNSTEIN, 1906).

Para o cálculo dos valores de p , *Odds ratio* (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% utilizou-se o software estatístico R (R Core Team, 2022) versão 4.2.1 (TEAM, 2022). Comparações estatísticas com $p \leq 0.05$ foram consideradas significativas.

4 RESULTADOS

Na Tabela 1 estão descritas as características demográficas dos casos (NIC2 e NIC3) e controles [HPV (+) sem lesão e HPV (-)], tendo participado deste estudo um total de 447 mulheres, distribuídas em quatro grupos: mulheres com lesões precursoras do câncer cervical (NIC2 e NIC3), mulheres HPV (+) sem lesão precursora e mulheres HPV (-).

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS CASOS E CONTROLES

	CASOS		CONTROLES	
	NIC2 (n=90)	NIC3(n=94)	HPV (+) (n=70)	HPV (-)(n=193)
Idade	31,1±7,1	32,6±6,6	27,2±6,7	32,6±7,3
Idade 1ªrelação	16,0±2,5	16,6±3,1	15,5±2,5	16,2±3,7
Nº gestações	1,8±1,3	2,2±2,2	1,6 ±1,3	2,8±1,8
Sem dado	-	-	13	29
Fumantes (%)				
Sim	37,8	27,7	18,6	23,3
Ex-fumante	17,8	22,3	41,4	35,8
Nunca	44,4	49,0	40,0	40,4
Sem dado	-	1,0	-	0,5
Idade 1ºparto	18,6±3,2	20,2±4,5	18,3±3,3	19,6±4,4
Uso contraceptivo (%)				
Sim	69,9	72,3	42,9	40,9
Não	30,1	26,6	57,1	58,6
Sem dado		1,1		0,5
Antecedentes IST (%)				
Sim	3,3	13,8	15,7	14,0
Não	96,7	85,1	82,9	85,0
Sem dado		1,1	1,4	1,0
Nº parceiros (total)	4,0(2,0-6,0)	4,0(2,0-8,0)	5,0(2,0-20,0)	5,0(3,0-10,0)
Nº parceiros (últimos 12 meses)	1,0(1,0-1,0)	1,0(1,0-1,0)	1,0(1,0-2,0)	1,0(1,0-1,0)
	CASOS		CONTROLE	
	NIC2 (n=90)	NIC3(n=94)	HPV (+) (n=70)	
HPV alto risco (%)				
16	36,7	45,7	15,7	
18	1,1	1,1	7,1	
16 e outros	26,7	21,3	11,4	
18 e outros	3,3	2,1	1,4	
16 e 18	1,1	1,1	1,4	
16,18 e outros	-	4,3	-	
Outros	31,1	24,5	27,1	
SR*	-	-	35,7	

Valores apresentados como média ± desvio padrão, mediana (IQR=intervalo interquartil, 25-75%), ou %

*SR = sem resultado

4.1 FREQUÊNCIAS DOS GENES *KIR* NOS GRUPOS NIC2, NIC3, HPV (+) E HPV (-) INDIVIDUALMENTE

As frequências dos genes *KIR* inibidores, ativadores, pseudogenes e genes de moldura (*framework genes*) estão demonstrados na tabela 2 e na figura 11 para os quatro grupos estudados.

Os genes de moldura (*KIR3DL2*, *KIR2DL4*, *KIR3DL3* e *KIR3DP1*), assim designados por estarem presentes em todos os haplótipos, apresentaram-se como esperado, com frequência de 100% em todos os grupos.

TABELA 2 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS PORTADORES DOS GENES *KIR*, SUAS FREQUÊNCIAS E FREQUÊNCIAS GÊNICAS ESTIMADAS EM CASOS E CONTROLES

Genes <i>KIR</i>	Casos (n=184)				Controles (n=263)			
	NIC 2 (n=90)		NIC 3 (n=94)		HPV (+) (n=70)		HPV (-) (n=193)	
	n (%)	fG	n(%)	fG	n(%)	fG	n(%)	fG
Genes de moldura/pseudogenes								
<i>KIR3DL2</i>	90(100)	1	94(100)	1	70(100)	1	193(100)	1
<i>KIR2DL4</i>	90(100)	1	94(100)	1	70(100)	1	193(100)	1
<i>KIR3DL3</i>	90(100)	1	94(100)	1	70(100)	1	193(100)	1
<i>KIR3DP1</i>	90(100)	1	94(100)	1	70(100)	1	193(100)	1
<i>KIR2DP1</i>	89 (99,0)	0,9	91 (97,0)	0,8	69(99,0)	0,9	188(97,4)	0,8
Genes Inibidores								
<i>KIR2DL1</i>	89 (99,0)	0,9	91 (97,0)	0,8	69(99,0)	0,9	187(97,0)	0,8
<i>KIR2DL2</i>	48(53,3)	0,3	51 (54,3)	0,3	16(23,0)	0,1	108(56,0)	0,3
<i>KIR2DL3</i>	84(93,3)	0,7	85 (90,4)	0,7	61(87,1)	0,6	172(89,1)	0,7
<i>KIR2DL5</i>	57(63,3)	0,4	59 (63,0)	0,4	20(29,0)	0,2	111(58,0)	0,4
<i>KIR3DL1</i>	86(96,0)	0,8	90 (96,0)	0,8	65(93,0)	0,7	184(95,3)	0,8
Genes Ativadores								
<i>KIR2DS1</i>	41(46,0)	0,3	46 (49,0)	0,3	13(19,0)	0,1	82 (43,0)	0,2
<i>KIR2DS2</i>	48(53,3)	0,3	52 (55,3)	0,3	12(17,1)	0,1	55 (29,0)	0,2
<i>KIRSDS3</i>	27(30,0)	0,2	27 (29,0)	0,2	16(23,0)	0,1	60 (31,0)	0,4
<i>KIR2DS4</i>	86(96,0)	0,8	90 (96,0)	0,8	66(94,3)	0,8	184 (95,3)	0,8
<i>KIR2DS4full</i>	50(56,0)	0,3	40 (43,0)	0,2	28(40,0)	0,2	101 (52,3)	0,3
<i>KIR2DS4D</i>	62(69,0)	0,4	77 (82,0)	0,6	55(79,0)	0,5	139 (72,0)	0,5
<i>KIR2DS5</i>	39 (43,3)	0,3	42 (45,0)	0,3	24(34,3)	0,2	72 (37,3)	0,5
<i>KIR3DS1</i>	40 (44,4)	0,3	38 (40,4)	0,2	28(40,0)	0,2	80 (42,0)	0,2

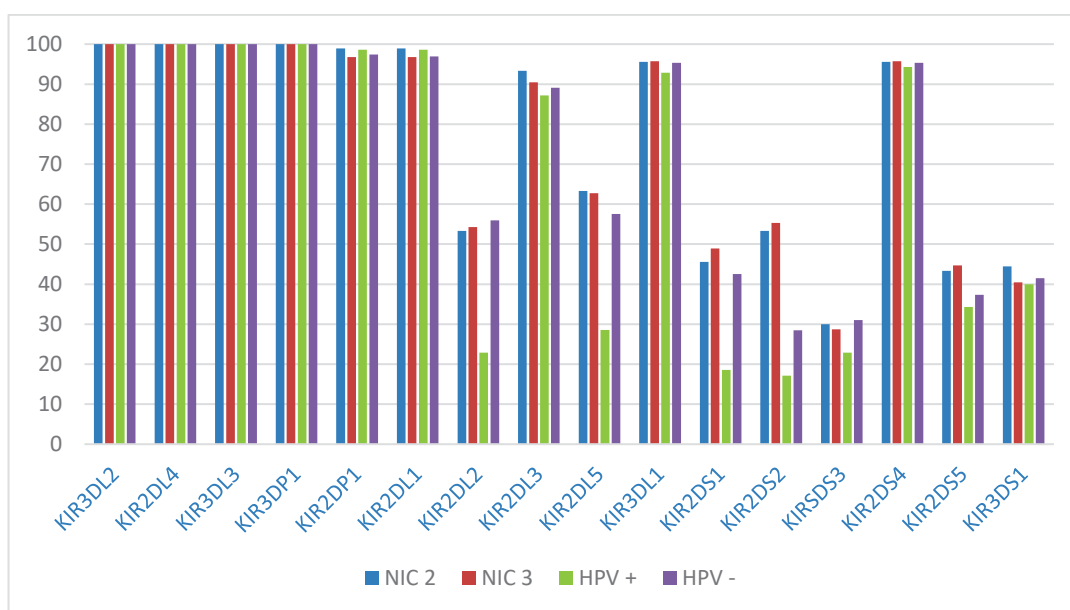
LEGENDA: n= nºde indivíduos portadores dos genes *KIR*, fG(%)=frequência gênica estimada de acordo com a fórmula de Bernstein

KIR2DS4D - gene *KIR2DS4* com deleção de 22 pb no exon 5. *KIR2DS4full* – gene funcional

FONTE: A autora (2024).

O pseudogene *KIR2DP1*, bem como os genes inibidores e ativadores apresentaram frequências similares nos quatro grupos, com exceções para os genes inibidores (*KIR2DL2* e *KIR2DL5*) e genes ativadores (*KIR2DS1*, *KIR2DS2*) que apresentaram distribuições diferentes com significância estatística nas comparações entre os grupos.

FIGURA 11 – COMPARAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS GENES *KIR* NOS CASOS E CONTROLES



FONTE: A autora (2024).

4.2 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DAS FREQUÊNCIAS DOS GENES *KIR* NOS CASOS (NIC2 E NIC3) E CONTROLES (HPV+ E HPV-)

4.2.1 Avaliação comparativa entre os grupos estratificados pelo critério de infecção pelo HPV

Nas comparações entre grupos estratificados pelo critério infecção pelo HPV [(NIC2, NIC3 e HPV(+)) e não infecção [(HPV(-)], observou-se que o gene inibidor *KIR2DL2* ($p = 0,03$; $OR = 0,7$; I.C.95%:[0,5 – 0,9]) mostrou-se mais frequente no grupo de mulheres não infectadas. O gene ativador *KIR2DS2* ($p < 0,001$; $OR = 1,9$; I.C.95%:[1,3 – 2,9]), mostrou-se mais frequente no grupo de mulheres HPV(+) (Tabela 3) .

TABELA 3 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS PORTADORES DOS GENES KIR, SUAS FREQUÊNCIAS E FREQUÊNCIAS GÊNICAS ESTIMADAS: NIC2, NIC3 E HPV (+) *VERSUS* HPV (-)

Genes KIR	NIC 2,3, HPV ⁺ (n=254)		HPV ⁻ (n=193)		OR	IC (95%)	p
	n (%)	fG	n(%)	fG			
Genes Inibidores							
KIR2DL1	249(98,0)	0,9	187(96,9)	0,82	-	-	0,46
KIR2DL2	115 (45,3)	0,3	108(56,0)	0,3	0,7	0,5-0,9	0,03
KIR2DL3	230(90,6)	0,7	172(89,1)	0,7	-	-	0,53
KIR2DL5	136(53,5)	0,3	111(57,5)	0,4	-	-	0,44
KIR3DL1	241(94,9)	0,8	184(95,3)	0,8	-	-	1
Genes Ativadores							
KIR2DS1	100(39,4)	0,2	82(42,5)	0,24	-	-	0,56
KIR2DS2	112(44,1)	0,3	55(28,5)	0,2	1,9	1,3-2,9	<0,001
KIRSDS3	70(27,6)	0,2	60(31,0)	0,4	-	-	0,46
KIR2DS4	242(95,3)	0,8	184(95,3)	0,8	-	-	1
KIR2DS4full	118(46,5)	0,3	101(52,3)	0,3	-	-	0,25
KIRS2DS4D	194(76,4)	0,5	139(72,0)	0,5	-	-	0,27
KIR2DS5	105(41,3)	0,2	72(37,3)	0,5	-	-	0,4
KIR3DS1	106(41,7)	0,2	80(41,5)	0,2	-	-	1

LEGENDA: p= Valor de p, OR=Odds ratio, IC (95%)=intervalo de confiança de 95%

Valores de p<0,05 considerado significativo

n = número de indivíduos portadores do respectivo gene, % - frequência, fG(%)=frequência gênica estimada de acordo com a fórmula de Bernstein

FONTE: A autora (2024).

4.2.2 Avaliação comparativa em mulheres HPV (+) estratificadas pela presença ou não de lesão intraepitelial cervical

Nas comparações entre todas as mulheres HPV+ estratificadas pelo critério da presença ou ausência de lesão intraepitelial cervical, (NIC 2 e NIC 3) *versus* controles HPV(+), os genes *KIR2DL2* (p < 0,001; OR = 3,9; I.C.95%:[2,1 - 7,5]), *KIR2DL5* (p < 0,001; OR = 4,2; I.C.95%:[2,3 - 7,9]) e os genes *KIR2DS1* (p < 0,001; OR = 3,9 e I.C.95%:[2,0 - 7,9]) e *KIR2DS2* (p < 0,001; OR = 5,7; I.C.95%:[2,9 - 11,8]) mostraram-se mais frequentes no grupo de mulheres com lesões (NIC2 e NIC3) (Tabela 4).

TABELA 4 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS PORTADORES DOS GENES KIR, SUAS FREQUÊNCIAS E FREQUÊNCIAS GÊNICAS ESTIMADAS: NIC2 E NIC3 *VERSUS* HPV (+)

Genes KIR	Casos		Controles				
	NIC 2 e 3 (n=184)		HPV + (n=70)				
	n (%)	fG	n (%)	fG	OR	IC (95%)	p
Genes Inibidores							
<i>KIR2DL1</i>	180(97,8)	0,9	69(98,6)	0,9	-	-	1
<i>KIR2DL2</i>	99(53,8)	0,3	16(23,0)	0,1	3,9	2,1-7,5	<0,001
<i>KIR2DL3</i>	169(91,9)	0,7	61(87,1)	0,6	-	-	0,7
<i>KIR2DL5</i>	116(63,0)	0,4	20(28,6)	0,2	4,2	2,34-7,85	<0,001
<i>KIR3DL1</i>	176(95,7)	0,8	65(92,9)	0,7	-	-	0,37
Genes Ativadores							
<i>KIR2DS1</i>	87(47,3)	0,3	13(18,6)	0,01	3,9	2,04-7,9	<0,001
<i>KIR2DS2</i>	100(54,4)	0,3	12(17,1)	0,1	5,7	2,9-11,8	<0,001
<i>KIR2DS3</i>	54(29,4)	0,2	16(22,9)	0,1	-	-	0,3
<i>KIR2DS4</i>	176(95,6)	0,8	66(94,3)	0,8	-	-	0,74
<i>KIR2DS4full</i>	90(48,9)	0,3	28(40,0)	0,2	-	-	0,21
<i>KIR2DS4D</i>	139(75,5)	0,5	55(78,6)	0,5	-	-	0,74
<i>KIR2DS5</i>	81(44,0)	0,3	24(34,3)	0,2	-	-	0,2
<i>KIR3DS1</i>	78(42,4)	0,2	28(40,0)	0,2	-	-	0,73

LEGENDA: p= Valor de p, OR=Odds ratio, IC (95%)=intervalo de confiança de 95%

Valores de p<0,05 considerado significativo

n = número de indivíduos portadores do respectivo gene, % - frequência, fG(%)=frequência gênica estimada de acordo com a fórmula de Bernstein

FONTE: A autora (2024).

4.2.3 Avaliação comparativa entre grupos de mulheres sem lesão intraepitelial cervical

Comparando-se mulheres HPV(+) sem lesão *versus* mulheres HPV(-), observou-se que a presença dos genes inibidores *KIR2DL2* ($p < 0,001$, $OR = 0,2$, I.C.95%:[0,1 - 0,4]), *KIR2DL5* ($p < 0,001$, $OR = 0,3$, I.C.95%:[0,2 - 0,5]) e do gene ativador *KIR2DS1* ($p < 0,001$, $OR = 0,3$, I.C.95%:[0,2 - 0,6]) mostraram-se mais frequentes e com significância estatística no grupo de mulheres HPV- (Tabela 5).

TABELA 5 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS PORTADORES DOS GENES KIR, SUAS FREQUÊNCIAS E FREQUÊNCIAS GÊNICAS ESTIMADAS: HPV (+) VERSUS HPV (-)

Genes <i>KIR</i>	Controles						
	HPV + (n=70)		HPV - (n=193)				
	n (%)	fG	n (%)	fG	OR	IC (95%)	p
Genes Inibidores							
<i>KIR2DL1</i>	69(98,6)	0,9	187(96,9)	0,8	-	-	0,68
<i>KIR2DL2</i>	16(23,0)	0,1	108(56,0)	0,3	0,2	0,1-0,4	<0,001
<i>KIR2DL3</i>	61(87,1)	0,6	172(89,1)	0,7	-	-	0,87
<i>KIR2DL5</i>	20(29,0)	0,2	111(58,0)	0,4	0,3	0,2-0,5	<0,001
<i>KIR3DL1</i>	65(92,9)	0,7	184(95,3)	0,8	-	-	0,53
Genes Ativadores							
<i>KIR2DS1</i>	13(19,0)	0,1	82(43,0)	0,2	0,3	0,2-0,6	<0,001
<i>KIR2DS2</i>	12(17,1)	0,09	55(28,5)	0,2	-	-	0,06
<i>KIR2DS3</i>	16(22,9)	0,1	60(31,0)	0,4	-	-	0,22
<i>KIR2DS4</i>	66(94,3)	0,8	184(95,3)	0,8	-	-	0,75
<i>KIR2DS4full</i>	28(40,0)	0,2	101(52,3)	0,3	-	-	0,08
<i>KIR2DS4D</i>	55(78,6)	0,5	139(72,0)	0,5	-	-	0,34
<i>KIR2DS5</i>	24(34,3)	0,2	72(37,3)	0,5	-	-	0,77
<i>KIR3DS1</i>	28(40,0)	0,2	80(41,5)	0,2	-	-	0,83

LEGENDA: p= Valor de p, OR=Odds ratio, IC (95%)=intervalo de confiança de 95%

Valores de p<0,05 considerado significativo

n = número de indivíduos portadores do respectivo gene, % - frequência, fG(%)=frequência gênica estimada de acordo com a fórmula de Bernstein

FONTE: A autora (2024).

4.2.4 Avaliação comparativa entre grupos de mulheres com lesão intraepitelial cervical

Na análise comparativa entre os grupos de mulheres NIC3 e NIC2 (Tabela 6) nenhum gene apresentou diferença estatística significativa entre os dois grupos.

TABELA 6 - NÚMERO DE INDIVÍDUOS PORTADORES DOS GENES KIR, SUAS FREQUÊNCIAS E FREQUÊNCIAS GÊNICAS ESTIMADAS: NIC3 VERSUS NIC2

Genes <i>KIR</i>	Casos				<i>p</i>
	NIC 3 (n=94)		NIC 2 (n=90)		
	n(%)	fG	n(%)	fG	
Genes Inibidores					
<i>KIR2DL1</i>	91 (96,8)	0,8	89 (99,0)	0,9	0,3
<i>KIR2DL2</i>	51 (54,3)	0,3	48 (53,3)	0,3	0,9
<i>KIR2DL3</i>	85 (90,4)	0,7	84 (93,3)	0,7	0,5
<i>KIR2DL5</i>	59 (63,0)	0,4	57 (63,3)	0,4	0,9
<i>KIR3DL1</i>	90 (96,0)	0,8	86 (96,0)	0,8	0,9
Genes Ativadores					
<i>KIR2DS1</i>	46(49,0)	0,3	41 (46,0)	0,3	0,7
<i>KIR2DS2</i>	52(55,3)	0,3	48 (53,3)	0,3	0,8
<i>KIR2DS3</i>	27(29,0)	0,2	27(30,0)	0,2	0,9
<i>KIR2DS4</i>	90(96,0)	0,8	86(96,0)	0,8	0,9
<i>KIR2DS4full</i>	40(43,0)	0,2	50(56,0)	0,3	0,1
<i>KIR2DS4D</i>	77(82,0)	0,6	62(69,0)	0,4	0,1
<i>KIR2DS5</i>	42(45,0)	0,3	39(43,3)	0,3	0,9
<i>KIR3DS1</i>	38(40,4)	0,2	40(44,4)	0,3	0,9

LEGENDA:

p= Valor de p, Valores de p<0,05 considerado significativo

n = número de indivíduos portadores do respectivo gene, % - frequência

fG(%)=frequência gênica estimada de acordo com a fórmula de Bernstein

KIR2DS4D - gene *KIR2DS4* com deleção de 22 pb no exon 5. *KIR2DS4full* - gene funcional

FONTE: A autora (2024).

4.3 GENÓTIPOS IDENTIFICADOS NOS CASOS E CONTROLES

Um total de 78 genótipos diferentes foram identificados no presente estudo. Por padronização, designados pela sigla GID (*genotype ID*), 22 genótipos foram identificados no grupo de casos NIC2 (n=90), 27 no grupo de casos NIC3 (n=94), 16 no grupo controle HPV⁺ (n=70) e 61 no grupo controle HPV⁻ (n=193). Oito genótipos foram comuns aos quatro grupos: GID# 1,2,3,4,5,6,7,71. Não foi detectado neste estudo, nenhum genótipo ainda não identificado, de acordo com AFND.

Conforme Figura 12, *pode-se* observar os 14 genótipos mais frequentes nos grupos de casos e controles, totalizando entre 62,2% e 85,7% de frequência em cada um dos grupos. No grupo de casos, o genótipo GID#1 (homozigoto AA) apareceu em 47 indivíduos, correspondendo a 28,9% no grupo de casos NIC2 e 22,3% no grupo de casos NIC3. Genótipos AB foram identificados em 148 mulheres dos grupos de casos (71,1% NIC2 e 77,7% NIC3), sendo que os genótipos mais frequentes no grupo de

casos NIC2 foram: *GID#3* com frequência de 13 vezes; *GID#2*, identificado 11 vezes; *GID#5* em 6 indivíduos; *GID#4* identificado 5 vezes e *GID#7*, 4 vezes. No grupo de casos NIC3 os genótipos mais frequentes foram: *GID#2* identificado 14 vezes, *GID#4* identificado 12 vezes, *GID#5* identificado 10 vezes, *GID#3* identificado 5 vezes e *GID#7* identificado 4 vezes. No grupo controle HPV (+) (n=70) o genótipo AA foi identificado em 25 mulheres, sendo 23 *GID#1* e 2 *GID#180*, num total de 35,7% dos casos. O genótipo AB foi identificado em 44 indivíduos (62,8%), sendo que os cinco genótipos mais frequentes foram: *GID#2* com frequência de 10 indivíduos, *GID#4* identificado em 7 indivíduos, *GID#5* em 6 indivíduos, *GID#3* em 5 indivíduos e empatados com 3 indivíduos cada um, *GID#7* e *GID#71*. Os demais genótipos AB apareceram uma ou duas vezes apenas. Um indivíduo neste grupo foi identificado com o genótipo homozigoto BB, *GID#74*. No grupo controle HPV (-) (n=193), foram identificados 61 genótipos. O genótipo AA (*GID#1*) foi identificado em 21,8% dos indivíduos. O genótipo AB foi identificado em 151 indivíduos (78,3%), sendo que os cinco genótipos com maior frequência foram: *GID#2*, *GID#4*, *GID#5*, *GID#51*, *GID#19* e *GID#18*, contendo respectivamente 16, 9, 9, 8 e 7 indivíduos.

FIGURA 12 - GENÓTIPOS COM MAIORES FREQUÊNCIAS NOS CASOS NIC2 E NIC3 E CONTROLES HPV(+) E HPV (-)

	GID	Genótipo KIR	Haplótipo A											Genes de moldura					Casos				Controles			
			Haplótipo A				Haplótipo B							Pseudogenes					NIC2		NIC3		HPV+		HPV -	
			2DL1	2DL3	3DL1	2DS4	2DL2	2DL5	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	3DS1	2DP1	3DP1	2DL4	3DL2	3DL3	n	%	n	%	n	%	n	%
1	1	AA	X	X	X	X								X	X	X	X	X	26	28,89	21	22,34	23	32,86	42	21,76
2	2	AB	X	X	X	X		X				X	X	X	X	X	X	X	11	12,22	14	14,89	10	14,29	16	8,29
3	3	AB	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	13	14,44	5	5,319	5	7,14	5	2,59
4	4	AB	X	X	X	X	X							X	X	X	X	X	5	5,556	12	12,77	7	10	9	4,66
5	5	AB	X	X	X	X	X	X		X	X			X	X	X	X	X	6	6,667	10	10,64	6	8,57	4	2,07
6	6	AB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	3	3,333	3	3,191	2	2,86	5	2,59
7	7	AB	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	4	4,444	4	4,255	3	4,29	3	1,55
8	8	AB	X	X	X	X		X	X		X			X	X	X	X	X	0	0	0	0	1	1,43	4	2,07
9	18	AB	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	7	3,63
10	19	AB	X	X	X	X	X	X						X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	8	4,15
11	20	AB	X	X	X	X	X	X				X		X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	4	2,07
12	31	AB	X	X	X	X	X	X		X				X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	4	2,07
13	51	AB	X	X	X	X	X	X			X			X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	9	4,66
14	71	AB	X		X	X	X	X		X	X			X	X	X	X	X	1	1,111	1	1,064	3	4,29	2	1,04
																			68	75,6	69	73,4	57	85,7	120	62,2

FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: Identificação dos genótipos (GID) e haplótipos que o compõem, com respectivos genes presentes. Frequência (%) e número de portadores de cada genótipo em cada grupo estudado.

Comparando-se os quatro grupos (APÊNDICE I), cinquenta e três genótipos foram identificados em apenas um deles. Apenas no grupo de casos NIC2 foram identificados os genótipos *GID#13*, 21, 32, 112, 205 e 361. Apenas no grupo NIC3 foram identificados os genótipos *GID#12*, 24, 56, 91, 113 e 382. Apenas no grupo HPV+ foram identificados os genótipos *GID#180*, 74, 75, 89 e 154. Apenas no grupo HPV- foram identificados 36 genótipos *GID#16*, 17, 18, 19, 20, 25, 27, 30, 31, 33, 38, 44, 51, 58, 61, 63, 64, 81, 94, 118, 193, 200, 260, 289, 294, 319, 337, 339, 370, 381,

477, 553, 554, 566, 587 e 685. Ao todo cinco genótipos encontrados na população estudada ainda não constavam catalogados em indivíduos da população brasileira até a finalização desta redação. São eles: *GID#63*, *GID#205*, *GID#361*, *GID#384* e *GID#477*, tendo aparecido em um único indivíduo do grupo HPV negativo os genótipos *GID#63*, *GID#384* e *GID#477*; em um único indivíduo do grupo NIC2 o *GID#205*; em 3 indivíduos do grupo NIC2 o *GID#361* e em 2 indivíduos do grupo HPV+ (*GID#384*) (FIGURA 13).

FIGURA 13 - GENÓTIPOS NÃO CONSTANTES DO AFND EM POPULAÇÃO BRASILEIRA

	GID	Genótipo KIR	Haplótipo A				Haplótipo B							Pseudogenes		Genes de moldura				Casos				Controles				
			2DL1	2DL3	3DL1	2DS4	2DL2	2DL5	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	3DS1	2DP1	3DP1	2DL4	3DL2	3DL3	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	63	AB	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.5	
2	205	AB	X	X	X	X			X		X		X	X	X	X	X	1	1.1	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	361	AB	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	3	3.3	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	384	AB			X	X		X	X				X	X	X	X	X	0	0	0	0	2	2.9	1	0.5			
5	477	AB		X	X	X	X		X	X			X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.5	
																		4	4.4	0	0	2	2.9	3	1.5			

FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: Identificação dos genótipos (GID) e haplótipos que o compõem, com respectivos genes presentes. Frequência (%) e número de portadores de cada genótipo em cada grupo estudado.

4.4 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE GENÓTIPOS *KIR* ENTRE OS GRUPOS DE CASOS E CONTROLES

Quanto aos genótipos, conforme descrito na tabela 7, nos quatro grupos a predominância foi de genótipo AB, com frequências variando de 62,9% HPV (+), 71,1% (NIC2), 77,7% (NIC3) a 78,30% [HPV (-)]. A presença de genótipo AA, apresentou frequência de 21,8% no grupo HPV(-), 22,3% no grupo NIC3; 28,9% no grupo NIC2 e 35,7% no grupo HPV (+). O genótipo BB foi observado em um único indivíduo do grupo controle HPV+ resultando em uma frequência de 1,4%.

TABELA 7 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS: CASOS (NIC2 E NIC3) E CONTROLES [HPV (+) E HPV (-)]

Genótipos/Haplótipos	Casos				Controles			
	NIC2 (n=90)		NIC3(n=94)		HPV (+) (n=70)		HPV (-) (n=193)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
A/A	26	28,90	21	22,3	25	35,7	42	21,8
A/B	64	71,1	73	77,7	44	62,9	151	78,3
B/B	0	0	0	0	1	1,4	0	0

LEGENDA: Haplótipo A: presença dos genes *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1* e *KIR2DS4*.

Haplótipo B presença dos genes *KIR2DL2*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1* FONTE: A autora (2024).

Conforme pode-se observar na tabela 8, o genótipo AA mostrou-se menos frequente em todos os grupos [NIC2, NIC3, HPV (+), HPV (-)] e em todas as

comparações, sem no entanto apresentar diferença estatística entre os grupos.

TABELA 8 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS ENTRE OS GRUPOS.

Genótipos /Haplótipos	NIC2, NIC3 e HPV (+) <i>versus</i> HPV (-)			NIC2e3 <i>versus</i> HPV (+)			HPV (+) <i>versus</i> HPV (-)			NIC2 <i>versus</i> NIC3		
	p	OR	IC (95%)	p	OR	IC (95%)	p	OR	IC (95%)	p	OR	IC (95%)
A/A	0,5	0,9	0,6-1,3	0,1	0,6	0,3-1,1	0,1	1,6	0,9-3,0	0,3	0,7	0,4-1,4
A/B		1			1			1			1	
B/B												

LEGENDA: p = valor de p, OR = Odds ratio, IC (95%) = intervalo de confiança de 95%. p < 0,05 considerado significativo.

Análise comparativa entre os grupos quanto aos genótipos.

FONTE: A autora (2024).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo é o maior já realizado em população brasileira investigando polimorfismo de genes *KIR* em pacientes com lesões precursoras do câncer cervical e controles, totalizando 447 indivíduos estudados, sendo 184 pacientes com lesões precursoras e 263 controles. É também a primeira vez que genótipos *KIR* foram avaliados frente aos genótipos que fazem parte do banco de dados internacional *Allele Frequency Net Database* (AFND) em estudo com pacientes diagnosticadas com lesões precursoras do câncer cervical.

Além dos genes de moldura e pseudogenes (*KIR3DL2*, *KIR2DL4*, *KIR3DL3*, *KIR3DP1* e *KIR2DP1*), os genes que apresentaram maiores frequências quando analisados individualmente nos quatro grupos foram os mesmos: *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1* e *KIR2DS4*. Alguns genes sobressaíram-se com menores frequências, como o gene *KIR2DS3*, sendo o de frequência mais baixa no grupo com lesão e no grupo HPV (-), sendo também um dos menos frequentes no grupo HPV(+) sem lesão. Estes dados corroboram frequências encontradas em população brasileira de acordo com a base de dados AFND e publicação de Jobim e colaboradores (GONZALEZ-GALARZA *et al.*, 2020; JOBIM *et al.*, 2013).

Nas análises comparativas entre os quatro grupos estudados, encontrou-se significância estatística quanto aos genes inibidores *KIR2DL2* e *KIR2DL5* e quanto aos genes ativadores *KIR2DS1*, *KIR2DS2*.

Observou-se que o gene ativador *KIR2DS2* apresentou frequência

significativamente aumentada em mulheres infectadas com ou sem lesão, comparativamente às não infectadas e juntamente com *KIR2DS1* apresentou maior frequência no grupo das infectadas com lesão comparativamente com as infectadas sem lesão. Na comparação das mulheres sem lesão entre si, infectadas ou não, o gene *KIR2DS1* apresentou maior frequência no grupo HPV negativo, possivelmente estando envolvido na destruição da célula alvo infectada, contribuindo para um resultado negativo quanto à presença do vírus. Quanto ao gene *KIR3DS1* relatado por Carrington como fator de maior risco para lesão de alto grau, não se confirmou no presente estudo (CARRINGTON *et al.*, 2005).

Comparando-se mulheres HPV (+) entre si, grupo com lesão *versus* sem lesão, observou-se frequência aumentada dos genes ativadores *KIR2DS1* e *KIR2DS2* em mulheres com lesão, sugestivo de predisposição ao desenvolvimento de lesão precursora de alto grau. Com relação ao gene *KIR2DS1*, esta possível relação com predisposição à presença de lesão foi mencionada por Carrington *et al* em 2005, porém com fraca associação (CARRINGTON *et al.*, 2005). Quanto ao gene *KIR2DS2*, Brestovac *et al* demonstrou através de seu estudo, relação inversa ao aqui encontrado, relatando possível correlação de proteção para lesões intraepiteliais cervicais de alto grau (BRESTOVAC *et al.*, 2013).

Em nossos resultados, quanto aos genes *KIR* inibidores, comparando-se grupo de mulheres HPV (+), com ou sem lesão, *versus* HPV (-) observou-se frequência significativamente aumentada do gene *KIR2DL2* em mulheres HPV (-), sugerindo-se efeito de proteção à infecção quando da presença deste gene. O mesmo foi observado na comparação entre os grupos HPV(+) sem lesão *versus* HPV(-), onde juntamente com o gene *KIR2DL2*, o gene *KIR2DL5* também apresentou frequência maior no grupo HPV (-). Sabendo-se que receptores inibidores participam da educação das células NK, supõe-se que células educadas pela contribuição destes receptores, teriam uma melhor capacidade de reconhecer a ausência do próprio e identificar as células infectadas (BODREAU *et al.*, 2019).

Nas comparações entre grupo de mulheres HPV (+) com lesão *versus* mulheres HPV (+) sem lesão, observamos também diferença significativa com maior frequência dos gene inibidores *KIR2DL2* e *KIR2DL5* no grupo com lesão, sugerindo-se contribuição para o desenvolvimento de lesão precursora cervical de alto grau. A princípio estes resultados parecem intrigantes. Genes agindo na proteção à infecção mas envolvidos no contexto de um processo neoplásico. Sabe-se porém, que células

tumorais não necessariamente diminuem a quantidade de HLA na superfície celular, pelo contrário, muitas vezes sua expressão é aumentada, sobretudo devido à inflamação ocasionada na vigência de tratamentos quimioterápicos. Numa minoria de casos ocorre a diminuição da expressão de moléculas HLA. Assim, as células neoplásicas muitas vezes conseguem escapar do ataque de células NK, mesmo tendo sido bem educadas (BOUDREAU e HSU, 2018). Além disto, recentemente foi demonstrado que KIR2DL5 é ligante da molécula de adesão PVR (receptor de poliovírus), ligação esta, que regula a citotoxicidade das células NK contra células tumorais. Quando há a ligação PVR/KIR2DL5 há a diminuição da citotoxicidade da célula NK (REN *et al.*, 2022). Expresso em malignidades, o PVR é tipicamente baixo em tecidos normais e níveis mais elevados têm sido associados a um mau prognóstico em diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer cervical (LIU *et al.*, 2022). Em relação ao aqui encontrado quanto a estes dois genes inibidores, estudo em população australiana em 2013 corrobora em parte estes resultados. Brestovac e colaboradores relataram fraca correlação protetiva do gene *KIR2DL2* para lesões intraepiteliais cervicais de alto grau (BRESTOVAC *et al.*, 2013). Rizzo *et al.* em 2014 investigando relação de ligantes HLA-C e alelos *KIR* com HPV e lesões cervicais concluíram que interação de ligantes HLA-C1 e genes *KIR2DL2/2DL3* levam à inibição de resposta de células NK para a infecção pelo HPV contribuindo para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (RIZZO *et al.*, 2014). Quanto ao gene *KIR2DL5*, em trabalho desenvolvido em população da Índia encontrou-se frequência mais alta no grupo de mulheres saudáveis do que no grupo de mulheres HPV (+), contribuindo para a provável relação de proteção deste gene contra a infecção pelo HPV. Neste mesmo estudo foi reportado pela primeira vez frequência significativamente alta de *KIR2DL1* em controles saudáveis, indicando sua possível proteção contra o câncer cervical. Ainda, foi observado frequência significativamente alta de *KIR2DL3* em mulheres infectadas pelo HPV o que deve ser um biomarcador para infecções virais (TEMBHURNE *et al.*, 2022). Estes resultados não foram confirmados em nosso estudo.

Na comparação entre mulheres com lesões intraepiteliais cervicais de grau 2 com mulheres com lesões grau 3, não se encontrou diferença entre os genes estudados individualmente.

Como já exposto, receptores inibidores estão envolvidos no processo de educação das células NK e seu preparo para o reconhecimento de células infectadas

por vírus. Os resultados aqui encontrados no que se refere ao receptor KIR2DL2, que se encontra aumentado no grupo das mulheres não infectadas pelo HPV, estaria relacionado com um reconhecimento mais efetivo da célula infectada, quando ocorre a diminuição da expressão de moléculas HLA.

Neste contexto, vale ressaltar que se torna de grande importância a comparação da composição de genes ativadores e inibidores que compõem o repertório do indivíduo mas sobretudo a avaliação dos ligantes HLA, visto que a presença ou ausência dos respectivos ligantes para receptores ativadores e/ou inibidores será capaz de resultar em diferentes graduações de ativação ou inibição da resposta citotóxica.

No presente estudo foram identificados 78 genótipos diferentes, todos eles já descritos na base de dados AFND. Constatou-se que destes, cinco ainda não constam catalogados em população brasileira na base de dados do AFND, tendo sido no entanto, descritos em outras populações: o genótipo *GID#477* foi descrito apenas na população chinesa, em 26 indivíduos, o *GID#384* foi descrito em população da França, Macedônia, Irã e Espanha, o *GID#361* foi descrito apenas na Indonésia, o *GID#205* consta descrito na população da Índia, China, Tailândia, Vietnã, Macedônia e República Tcheca e o *GID#63* em população da Alemanha, Tailândia, Macedônia, Bélgica, Índia, Grécia, Bulgária, República Tcheca, China, Irã e Uzbequistão (GONZALEZ-GALARZA *et al.*, 2020).

Genótipos associados aos haplótipos B, que contêm predominantemente genes *KIR* ativadores, foram encontrados em maior proporção em todos os grupos estudados. Na análise comparativa entre os grupos, não houve, no entanto, diferença significativa quanto aos genótipos.

A população brasileira está pouco representada nesta base de dados, onde constam resultados de genotipagem *KIR* de apenas 2.400 indivíduos. Precisamos juntar esforços para que o repertório *KIR* de brasileiros seja mais estudado visando avançar na análise da importância deste marcador envolvido na resposta imunológica, trazendo benefícios para a ciência e em especial às mulheres brasileiras, ainda muito acometidas pela infecção pelo HPV e em consequente risco de desenvolvimento do câncer cervical.

5.1 LIMITAÇÕES

No presente estudo não foram analisados casos de câncer cervical propriamente, nem foram analisados os genes dos ligantes para os receptores *KIR*, as moléculas HLA, caracterizando-se estes como fatores limitantes para uma análise mais aprofundada.

5.2 PERSPECTIVAS

Para futuro, a perspectiva é a continuidade desta pesquisa estendendo-a para pacientes diagnosticadas com câncer cervical, incluindo a avaliação dos ligantes dos receptores *KIR*, com o objetivo de se ter um melhor entendimento dos resultados aqui encontrados e uma compreensão mais ampla no que se refere ao papel do repertório *KIR* na dinâmica da resposta imunológica frente a este diagnóstico tão comprometedor para a saúde e vida das mulheres.

6 CONCLUSÃO

- Os genes de moldura *KIR3DL2*, *KIR2DL4*, *KIR3DL3* e *KIR3DP1* além do pseudogene *KIR2DP1*, bem como os genes inibidores e ativadores apresentaram frequências similares nos grupos participantes do estudo. Encontrou-se significância estatística quanto aos genes inibidores (*KIR2DL2* e *KIR2DL5*) e os genes ativadores (*KIR2DS1* e *KIR2DS2*) quando das comparações entre os grupos.
- O gene *KIR2DS1* apresenta-se com frequência aumentada no grupo das não infectadas, sugerindo-se possível associação de proteção contra infecção pelo HPV. Quando a infecção está presente, no entanto, assim como ocorre com o gene *KIR2DS2*, o gene *KIR2DS1*, com frequência significativamente maior no grupo das mulheres com lesão precursora, sugere-se estar associado positivamente com a presença de lesão.
- O aumento da frequência do gene *KIR2DL2* no grupo das infectadas deve-se às pacientes com lesões precursoras. Na ausência de lesão, sua frequência é maior no grupo das HPV negativas comparativamente às HPV positivas. Por este achado, sugere-se que este gene esteja associado com proteção à infecção, mas quando da sua presença, como com o gene *KIR2DL5*, haveria

associação positiva com o desenvolvimento de lesão precursora do câncer cervical.

- Não houve diferença estatística significativa na comparação entre os genes comparando-se os grupos NIC2 e NIC3.
- Não houve diferença estatística significativa na estratificação e comparação entre os grupos pelo critério da infecção pelo HPV ou pelo critério da presença da lesão no que se refere às frequências genotípicas.
- Nosso estudo contribui fornecendo dados referentes ao envolvimento das células NK no cenário da resposta à infecção pelo HPV e no desenvolvimento de lesões precursoras além de apresentar pela primeira vez a descrição dos genótipos encontrados em população brasileira avaliada para o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, Leonardo M. *et al.* Cost-effective and fast KIR gene-content genotyping by multiplex melting curve analysis. **HLA**, v. 92, n. 6, p. 384-391, 2018.
- ARNHEIM, L.; DILLNER, Joakim; SANJEEVI, C. B. A population-based cohort study of KIR genes and genotypes in relation to cervical intraepithelial neoplasia. **Tissue antigens**, v. 65, n. 3, p. 252-259, 2005.
- BAO, Xiao *et al.* HLA and KIR associations of cervical neoplasia. **The Journal of infectious diseases**, v. 218, n. 12, p. 2006-2015, 2018.
- BARROW, Alexander David; COLONNA, Marco. Exploiting NK cell surveillance pathways for cancer therapy. **Cancers**, v. 11, n. 1, p. 55, 2019.
- BERNSTEIN, Serge. Sur la généralisation du problème de Dirichlet: Première partie. **Mathematische Annalen**, v. 62, n. 2, p. 253-271, 1906.
- BJÖRKSTRÖM, Niklas K.; STRUNZ, Benedikt; LJUNGGREN, Hans-Gustaf. Natural killer cells in antiviral immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 22, n. 2, p. 112-123, 2022.
- BOSCH, F. Xavier *et al.* Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. **Vaccine**, v. 31, p. H1-H31, 2013.
- BOUDREAU, Jeanette E.; HSU, Katharine C. Natural killer cell education in human health and disease. **Current opinion in immunology**, v. 50, p. 102-111, 2018.
- BRAATEN, Kari P.; LAUFER, Marc R. Human papillomavirus (HPV), HPV-related disease, and the HPV vaccine. **Reviews in obstetrics and gynecology**, v. 1, n. 1, p. 2, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA), 12 maio 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br>. Acesso em: 02 maio 2023.
- BRESTOVAC, Brian *et al.* Human papillomavirus, high-grade intraepithelial neoplasia and killer immunoglobulin-like receptors: a Western Australian cohort study. **Infectious agents and cancer**, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2013.
- BRUNI, Laia *et al.* Global and regional estimates of genital human papillomavirus prevalence among men: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Global Health**, v. 11, n. 9, p. e1345-e1362, 2023.
- CARRINGTON, Mary *et al.* Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 7, p. 1069-1075, 2005.
- CHONG, Gun Oh *et al.* Conservative Treatment for Patients with Carcinoma in Situ-

Positive Margins After a Loop Electro excisional Procedure: Is It Safe?. **The Journal of Reproductive Medicine**, v. 62, n. 1-2, p. 37-44, 2017.

DAVIES, James OJ *et al.* Opportunities and limitations of natural killer cells as adoptive therapy for malignant disease. **Cytotherapy**, v. 16, n. 11, p. 1453-1466, 2014.

DE FRANÇA, P. P. Carcinoma cervical e suas lesões precursoras: fatores epidemiológicos e o papel dos genes MICA, NKG2D, HLA-B e HLA-DRB1 na oncogênese do cancer. 2012. 206f. Tese de doutorado em genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

DELIGEOROGLOU, Efthimios *et al.* HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. **Infectious diseases in obstetrics and gynecology**, v. 2013, 2013.

DE SANJOSE, Silvia; BROTONS, Maria; PAVON, Miguel Angel. The natural history of human papillomavirus infection. **Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 47, p. 2-13, 2018.

DE VILLIERS, Ethel-Michele *et al.* Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DOVNIK, Andraž; POLJAK, Mario. The Role of Methylation of Host and/or Human Papillomavirus (HPV) DNA in Management of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2 (CIN2) Lesions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6479, 2023.

FONTHAM, Elizabeth TH *et al.* Cervical cancer screening for individuals at average risk: 2020 guideline update from the American Cancer Society. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 70, n. 5, p. 321-346, 2020.

GILLIO-TOS, Anna *et al.* Case-control study of HLA-G promoter methylation status, HPV infection and cervical neoplasia in Curitiba, Brazil: a pilot analysis. **BMC cancer**, v. 12, p. 1-10, 2012.

GONZALEZ-GALARZA, Faviel F. *et al.* Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools. **Nucleic acids research**, v. 48, n. D1, p. D783-D788, 2020.

GRAU-BEJAR, Juan Francisco *et al.* Advances in immunotherapy for cervical cancer. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 15, p. 17588359231163836, 2023.

GRAVITT, Patti E.; WINER, Rachel L. Natural history of HPV infection across the lifespan: role of viral latency. **Viruses**, v. 9, n. 10, p. 267, 2017.

GUILLEREY, Camille; HUNTINGTON, Nicholas D.; SMYTH, Mark J. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. **Nature immunology**, v. 17, n. 9, p. 1025-1036, 2016.

GUMPERZ, Jenny E. et al. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 3, p. 1133-1144, 1995.

GUTIÉRREZ-HOYA, Adriana; SOTO-CRUZ, Isabel. NK Cell Regulation in Cervical Cancer and Strategies for Immunotherapy. **Cells**, v. 10, n. 11, p. 3104, 2021.

HALLE, Mari Kylesø *et al.* Clinicopathologic and molecular markers in cervical carcinoma: a prospective cohort study. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 217, n. 4, p. 432. e1-432. e17, 2017.

HERBERMAN, Ronald B.; NUNN, Myrthel E.; LAVRIN, David H. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. **International journal of cancer**, v. 16, n. 2, p. 216-229, 1975.

HIBY, Susan E. et al. Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 11, p. 4102-4110, 2010.

JAISAMRARN, Unnop *et al.* Correction: Natural History of Progression of HPV Infection to Cervical Lesion or Clearance: Analysis of the Control Arm of the Large, Randomised PATRICIA Study. **Plos one**, v. 8, n. 12, 2013.

JOBIM, Maria Regina et al. Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in breast cancer and control group. **Human Immunology**, v. 74, n. 9, p. 1130-1133, 2013.

JOST, S.; ALTFELD, M. Control of human viral infections by natural killer cells. **Annu. Rev. Immunol.** 31, 163–194, 2013.

KANNAN, Geoffrey S.; AQUINO-LOPEZ, Arianexys; LEE, Dean A. Natural killer cells in malignant hematology: A primer for the non-immunologist. **Blood Reviews**, v. 31, n. 2, p. 1-10, 2017.

KLEIN, J. e Sato J, Sato A. **The HLA system**. 2000.

KIM, Nayoung; KIM, Hun Sik. Targeting checkpoint receptors and molecules for therapeutic modulation of natural killer cells. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2041, 2018.

KULKARNI, Smita; MARTIN, Maureen P.; CARRINGTON, Mary. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2008. p. 343-352.

LIU, Yu *et al.* Current strategies against persistent human papillomavirus infection. **International Journal of Oncology**, v. 55, n. 3, p. 570-584, 2019.

LIU, Wen-Feng *et al.* PVR—A Prognostic Biomarker Correlated with Immune Cell Infiltration in Hepatocellular Carcinoma. **Diagnostics**, v. 12, n. 12, p. 2953, 2022.

MAESTRI, Carlos Afonso *et al.* MASP-1 and MASP-2 serum levels are associated with worse prognostic in cervical cancer progression. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2742, 2018.

MANDAL, Arundhati; VISWANATHAN, Chandra. Natural killer cells: In health and disease. **Hematol Oncol Stem Cell Ther**, 2015.

MAO, Rui *et al.* Clinical significance and immune landscape of KIR2DL4 and the senescence-based signature in cutaneous melanoma. **Cancer Science**, v. 113, n. 11, p. 3947, 2022.

MARANGON, Amanda Vansan *et al.* The association of the immune response genes to human papillomavirus-related cervical disease in a Brazilian population. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

MINION, Lindsey E.; TEWARI, Krishnansu S. Cervical cancer—state of the science: from angiogenesis blockade to checkpoint inhibition. **Gynecologic oncology**, v. 148, n. 3, p. 609-621, 2018.

MURPHY, K. *et al.* **Imunobiologia de Janeway**. 7.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

NAYYAR, Gaurav; CHU, Yaya; CAIRO, Mitchell S. Overcoming resistance to natural killer cell-based immunotherapies for solid tumors. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 51, 2019.

OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. HPV e câncer do colo do útero. **OMS - Organização mundial da saúde**, 05 março 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/hpv-e-cancer-do-colo-do-utero>. Acesso em 02 abril 2023.

PARHAM, Peter. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nature reviews immunology*, v. 5, n. 3, p. 201-214, 2005.

PENDE, Daniela *et al.* Killer Ig-like receptors (KIRs): their role in NK cell modulation and developments leading to their clinical exploitation. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1179, 2019.

PURDY, Amanda K.; CAMPBELL, Kerry S. Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR). **Cancer biology & therapy**, v. 8, n. 23, p. 2209-2218, 2009.

QUATRINI, Linda *et al.* Human NK cells, their receptors and function. **European journal of immunology**, v. 51, n. 7, p. 1566-1579, 2021.

RAULET, David H.; VANCE, Russell E. Self-tolerance of natural killer cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 7, p. 520-531, 2006.

RAJAGOPALAN, Sumati; FU, Jacqueline; LONG, Eric O. Cutting edge: induction of IFN- γ production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4

(CD158d) in resting NK cells. **The Journal of immunology**, v. 167, n. 4, p. 1877-1881, 2001.

RAJALINGAM, Raja. Diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease. **Clinics in laboratory medicine**, v. 38, n. 4, p. 637-653, 2018.

REN, Xiaoxin *et al.* Blockade of the immunosuppressive KIR2DL5/PVR pathway elicits potent human NK cell-mediated antitumor immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 132, n. 22, 2022.

REYBURN, Hugh *et al.* Human NK cells: their ligands, receptors and functions. **Immunological reviews**, v. 155, n. 1, p. 119-125, 1997.

RIZZO, Roberta *et al.* Implication of HLA-C and KIR alleles in human papillomavirus infection and associated cervical lesions. **Viral immunology**, v. 27, n. 9, p. 468-470, 2014.

RIZZO, S.; SCHIUMA, G.; BELTRAMI, S.; GENTILI, V.; RIZZO, R.; BORTOLOTTI, D. Role of KIR Receptor in NK Regulation during Viral Infections. **Immunol**, 1, 305-331, 2021.

ROBINSON, James *et al.* Ipd-imgt/hla database. **Nucleic acids research**, v. 48, n. D1, p. D948-D955, 2020.

SÁNCHEZ-SILES, Mariano *et al.* Prevalence of human papillomavirus in the saliva of sexually active women with cervical intraepithelial neoplasias. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 25, n. 2, p. e195, 2020.

SENAPATI, Rashmirani; SENAPATI, Nihar Nalini; DWIBEDI, Bhagirathi. Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. **Infectious Agents and Cancer**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2016.

SINGH, Deependra *et al.* Global estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2020: a baseline analysis of the WHO Global Cervical Cancer Elimination Initiative. **The Lancet Global Health**, v. 11, n. 2, p. e197-e206, 2023.

SONG, Dan *et al.* Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer. **Oncology letters**, v. 10, n. 2, p. 600-606, 2015.

SUNG, Hyuna *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TEAM, R. Development Core. R: a language and environment for statistical computing, 2022. **Vienna, Austria**. Disponível em: <http://www.R-project.org>.

TEIXEIRA, Julio Cesar *et al.* Cervical cancer registered in two developed regions from Brazil: Upper limit of reachable results from opportunistic screening. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia/RBGO Gynecology and Obstetrics**, v.

40, n. 06, p. 347-353, 2018.

TEIXEIRA, Júlio César *et al.* Incidence rates and temporal trends of cervical cancer relating to opportunistic screening in two developed metropolitan regions of Brazil: a population-based cohort study. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 137, p. 322-328, 2019.

TEMBHURNE, Alok K. *et al.* Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene contents: Are they associated with cervical cancer? **Journal of Medical Virology**, v. 95, n. 1, p. e27873, 2022.

TONEVA, M. *et al.* Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. **Tissue antigens**, v. 57, n. 4, p. 358-362, 2001.

UHRBERG, Markus; PARHAM, Peter; WERNET, Peter. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. **Immunogenetics**, v. 54, p. 221-229, 2002.

VOLTARELLI JC, *et al.* Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. Editora Atheneu, 2009.

WOODMAN, Ciaran BJ; COLLINS, Stuart I.; YOUNG, Lawrence S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11-22, 2007.

ZHANG, Jiexin *et al.* Human papillomavirus type 16 disables the increased natural killer cells in early lesions of the cervix. **Journal of immunology research**, v. 2019, 2019.

ZHOU, Chenhao; TUONG, Zewen Kelvin; FRAZER, Ian Hector. Papillomavirus immune evasion strategies target the infected cell and the local immune system. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 682, 2019.

ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO a) Você está sendo convidado para participar da pesquisa intitulada “A investigação de polimorfismos genéticos em tecido normal e tecido cervical neoplásico como marcadores do desenvolvimento e progressão do câncer do colo do útero”. É através da pesquisa científica que avanços médicos são possíveis e, portanto a sua participação é de importância fundamental.

b) O objetivo principal do trabalho presente é a investigação de certas características do sistema imune que são capazes de eliminar o vírus do papiloma humano (o HPV) na grande maioria das mulheres. O HPV é transmitido durante a relação sexual sem proteção e, na maioria das mulheres, o mesmo é eliminado pelo sistema imune. Entretanto, em algumas mulheres a infecção pelo HPV pode perdurar levando a alterações detectáveis pelo Exame de Papanicolaou, ou até mesmo ao câncer do colo do útero. A participação de mulheres livres de doença e infectadas pelo HPV é de grande importância para atingir um entendimento fundamental e possivelmente o desenvolvimento de métodos de diagnósticos novos, vacinas e novas drogas.

c) Se você decidir participar desta pesquisa, além do Exame de Papanicolaou para o qual você foi referida a este Hospital, as suas células cervicais serão testadas para a presença do HPV. Além disto, você será convidada a doar 10mL de sangue a ser coletado com material estéril e a preencher um questionário breve.

d) Você pode ser positiva para a infecção pelo HPV e ter o resultado do Exame de Papanicolaou normal. Se o seu resultado for positivo para HPV, será oferecido a você o gerenciamento de rotina e exames repetidos.

e) Não há riscos para você além daqueles pertinentes a coleta rotineira de sangue.

f) É seu direito ter toda informação referente à sua participação e os resultados de todos os exames realizados com as suas amostras a qualquer hora.

g) A sua participação neste estudo é voluntária.

h) O material relacionado à pesquisa será acessível somente aos pesquisadores diretamente envolvidos na pesquisa e pelas autoridades legais. Se qualquer informação vier a ser publicada ela será codificada e, portanto a sua confidencialidade será mantida. Acesso aos resultados a terceiros não será permitido, incluindo empregador, supervisores, companhias de seguro, etc. Uma alíquota do seu DNA extraído das suas células cervicais será enviada ao Laboratório de Epidemiologia Molecular da “Università degli Studi di Torino” (Itália) para a análise da infecção pelo HPV e o status de metilação do

HLA-G. i) Não caberá qualquer custo a você quanto aos procedimentos e exames realizados nesta pesquisa. j) Pela sua participação neste estudo você não receberá qualquer pagamento. k) Os pesquisadores responsáveis por este projeto são prof.^a Dr.^a Maria da Graça Bicalho, tel.: (41) 3361-1729 (laboratório), (41) 9973-5855 (celular), prof. Dr. Newton Sérgio de Carvalho (41) 3335-7474 e Dr. Carlos Alfonso Maestri (41) 3361-5000 e na Itália o prof. Franco Merletti (tel.: +39 011 633430606), Chefe da Unidade de Epidemiologia do Câncer, “Università degli Studi di Torino”

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e o objetivo da pesquisa para a qual eu fui convidada a participar. A explicação recebida enfatizou o fato de eu precisar doar uma amostra de sangue e material do colo de útero e de que eu sou livre de interromper minha participação a qualquer momento que eu decida fazê-lo sem que isto prejudique qualquer acompanhamento médico na Instituição onde estou consultando.

Eu voluntariamente concordo em participar desta pesquisa.

_____	____/____/____	_____
Paciente/Controle	Assinatura	Data
		Pesquisador

ANEXO II – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

***Teve relação sexual nas últimas 24h? Se positivo excluir do estudo.

Questionário para avaliação dos fatores de risco.

ID: Nome: _____

Data de nascimento: _____

RG/CPF: _____

1. Idade em que ocorreu a primeira relação sexual (anos)
2. Número de parceiros sexuais desde o início da atividade sexual
3. Uso de hormônios contraceptivos:
 - a) Faz uso de hormônios contraceptivos (presente) Sim ☐ Não ☐ Fez uso? _____ Qual (is): _____
 - b) Idade em que iniciou o uso
 - c) Tempo de uso do anticoncepcional durante a vida
4. Número de gestações
 - a) Idade ao primeiro parto
5. Escolaridade: ☐ Ens. Fundam. Incomp. ☐ Ens. Médio. Incomp. ☐ Ens. Superior Incomp. ☐ Ens. Fund. Comp. ☐ Ens. Médio Comp. ☐ Ens. Superior Comp.
6. Etnia: ☐ Branco ☐ Preto ☐ Pardo ☐ Asiático
7. Fumante
 - a) Sim ☐
 - b) Ex-fumante ☐
 - c) Nunca ☐
 - c.1) Fuma há quanto tempo? (anos)

c.2) Cigarros/dia

b.1) Parou há quanto tempo? (anos)

b.2) Fumou por quanto tempo? (anos)

b.3) Cigarros/dia

8. Quando foi o último preventivo?

Mês ano

9. Apresentou alguma citologia oncótica (PREVENTIVO) alterada? Sim ☐

Não ☐

10. Número de parceiros sexuais nos últimos 12 meses

11. Uso de preservativo nos últimos 12 meses:

i. Regular ☐

ii. Ocasional ☐

iii. Nunca ☐

12. Usuária de DIU ☐ sim ☐ não

Se retirou o DIU, a quanto não faz mais uso anos

13. Antecedentes de DST

a. Tem ou teve alguma DST*? Sim ☐

Não ☐

*não considerar se a paciente estiver no momento em tratamento para lesão de alto grau.

14. Cauterização:

a) Já teve alguma cauterização?

Não ☐

Sim ☐ Colo ☐ Vagina ☐ Vulva ☐ Ânus ☐

15. Quantas citologias oncóticas (preventivo) foram feitas durante a vida?

Entrevistador: _____

Data:

ANEXO III – SUPLEMENTO de Amorim *et al.*, 2018

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6433384/bin/NIHMS1006733-supplement-Supplementary_Material.docx

ANEXO IV – Artigo publicado

EDITORIAL

CURRENT SCENARIO OF BIOMARKERS IN CERVICAL CANCER AND ONCOGENESIS BY HPV

CENÁRIO ATUAL DOS BIOMARCADORES NO CÂNCER CERVICAL E NA ONCOGÊNESE PELO HPV

Luciane Rocha Ernlund Pangracio¹ , Danielle Betina de Oliveira Traesel² ,
Newton Sérgio de Carvalho^{2,3} , Maria da Graça Bicalho^{2,4,5} 

Cervical cancer (CC) is related to HPV infection and represents the third cause of cancer in women. Annually, more than 500,000 new cases are reported worldwide, with significant death rates. It develops due to genetic and epigenetic alterations that control cell growth and differentiation, and may cause death. These alterations induce uncontrolled cell division and invasion of cervical tissue have severe consequences to women's health⁽¹⁾. CC incidence and mortality drop considerably since the implementation of screening tests and vaccination strategies. Nevertheless, CC continues to have a high incidence, mainly in low-income countries, where these programs do not cover territorial frontiers and there is lack of resources to implement vaccination or screening tests. Oncogenic HPV types reached 25% of cases in Brazil over the last years⁽²⁾, and there was no modification on HPV types after four years of the vaccination program, according to Tota et al.⁽³⁾. Usually, screening tests in Brazil cover women from 25 to 64 years old. According to Teixeira et al.⁽⁴⁾, rates of CC under the age of 25 tend to increase, and women over 64 achieved roughly 20% of CC on research of Brazilian women from two high-income cities.

HPV 16 and 18 are the predominant genotypes linked to progression to invasive cancer. HPV uses evasion mechanisms of the immune system in early and late stages of the infection, causing its persistence in cutaneous and mucosal tissues. Its continuous expression of viral proteins E6 and E7 contribute to disease progression⁽⁵⁾. Starting lesions are well defined and classified into cervical intraepithelial neoplasm 1, 2, and 3, with grade 3 being the highest level of evolution. Factors such as age, smoking, sexually transmitted disease, long-term oral contraceptive use, and parity are associated to a higher risk of cervical cancer development^(6,7). Many CIN 1, 2, and some CIN 3 lesions spontaneously revert. Even though, treatment is still needed, because they have high chances to progress⁽⁸⁾. Treatment just after diagnosis can include from large loop excision

of the transformation zone (LLETZ), loop electrosurgical excision procedure (LEEP) to cold-knife conization (CKC), and sometimes other treatment modalities, as laser or cryosurgery. Incidence among young women has expressive rates, and treatment can relate to severe consequences in the reproductive function, such as fetal consequences of low birth weight, premature birth, and miscarriage^(9,10).

Molecular markers appear to be of fundamental importance, not only to make the diagnostic, but also to help the treatment establishment, working as a tool to assess the individual patient's risk of having cancer. The best biomarker would be 100% sensibility and specificity, which is not a reality yet⁽¹¹⁾. Biomarkers specific to cervical cancer would be of great value, making it possible to identify which CC precursor lesions would progress, influencing clinical decision-making. Scientific research focus on finding biomarkers from:

- identification of wrong protein expression due to oncogenes;
- detection of methylation alterations on cell genes, predicting neoplasia process;
- identification of chromosomal or genetic modifications due to viral integration;
- expression of genic polymorphism in association with a better prognostic^(1,10,11).

The present editorial was written to provide readers with the recent scenario regarding molecular markers and its impregnability on diagnosis, treatment, and follow up of cervical precancer and cancer patients. According to current literature, research articles report many possible biomarkers to help with cervical cancer diagnosis, treatment, and prognosis. Immunologic markers are of great interest. Programmed Death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) can blockade T lymphocytes function and allow tumoral growth⁽¹²⁾. Allelic variations of Human Leukocyte Antigen (HLA) genes are associated to genetic susceptibility in cervical cancer development in the presence of high-risk DNA-HPV11. The overexpression of HLA-E seems to trigger signalization pathways to engage Natural Killer (NK) activating receptors, such as NKG2D, contributing to NK activation against viral infection⁽¹³⁾. The allelic variants MICA*008:01/04 and MICA*018:01 are associated to the risk of CC development, and MICA-129 Val is related to the risk of tumoral development⁽⁷⁾.

Squamous cell carcinoma antigen (SCC-Ag) is related to tumoral size, stromal invasion, and disease relapse⁽¹⁴⁾. Carcinoembryonic Antigen (CEA) is linked to cervical squamous neoplasia when it has higher levels and impact on prognostic on cervical adenocarcinoma⁽¹⁵⁾. There was no association of Mannose-binding lectin (MBL) with lesions progression or with cervical onogenesis⁽¹⁷⁾. However, products

¹Laboratory of Immunogenetics, and Gynecology and Obstetrics and Women Health Post Graduation Program, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – Curitiba (PR), Brazil.

²Gynecology and Obstetrics and Women Health Post Graduation Program, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná – Curitiba (PR), Brazil.

³Department of Gynecology and Obstetrics, Universidade Federal do Paraná – Curitiba (PR), Brazil.

⁴Department of Genetics, Universidade Federal do Paraná – Curitiba (PR), Brazil.

⁵Laboratory of Immunogenetics and Hystocompatibility, Universidade Federal do Paraná – Curitiba (PR), Brazil.

of MBL — MASP-1, MASP-2, and MASP-19, showed higher levels related to tumoral progression and a worse prognostic in cervical neoplasia patients⁽¹⁴⁾.

Proteins coded by virus oncogenes E6 and E7 interfere in apoptosis and cell regulation. For that reason, tumor suppressor proteins, such as p53, p16^{INK4a}, and Ki-67 were investigated as potential targets. Virus-infected cells express p16 to control irregular cell cycle, which is not present in healthy cervical cells, but is one hundred percent present in high-grade lesions cells^(15,16). Protein 53 (p53) encoded by the gene TP53, seems to be higher in patients with cancer stage II, III and IV, according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO), older than 48, and with tumor size >= 4 mm and. Absence of p53 is significantly associated with tumors <4 cm, adenocarcinoma and deep invasion⁽¹⁰⁾. Histological distribution of Ki-67 is modified, with HPV infection being associated to high-risk HPV infection⁽¹⁴⁾.

Some genes are involved in neoplastic processes. Gene cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDKN3) is higher in cervical cancer patients, related to it in 31.85% of cases with five years of survival. In those patients that died, survival was of 14 months. *In vitro*, its inactivation showed lower tumoral proliferation, which can be used in the future to develop new strategies to treat neoplasia⁽¹⁷⁾. The methylation process is of importance in the HPV oncogenic pathway, and Fiano et al.⁽¹⁸⁾ showed that DNA methylation in HPV positive women is associated to high-risk CIN. DNA methylation in host genes and HPV genome is associated to cervical oncogenesis^(16,18). Some molecules, such as GHSR, SST, and ZIC1, from 3q chromosome, *in vitro*, are associated to a higher risk of progression from precursor lesions detected by cytology⁽⁹⁾. Gene STK31, after aberrant methylation by E7-HPV16, is considered an oncogenic precursor and risk marker to invasive neoplasia⁽¹⁹⁾.

Genotyping HPV is being incorporated in population screening, and it is used to identify tumoral aggressiveness. Whereas HPV 16 is a marker of high-risk lesion, a better disease-free survival was observed in HPV16 cases, more sensitive to treatment, with a lower rate of growth, and better immune response to virus⁽⁹⁾. Besides genotyping, viral load, viral physical status, and circulating fraction of DNA-HPV are biomarkers that need to be better understood^(1,16,20,21).

Genomic and immunologic techniques are the oncology vanguard, whose applications include cervical cancer patients. Limitations to the use of these techniques are costs and population size, which contribute to insufficient scientific evidence to change protocols in use.

From an overall reading of the available literature on biomarkers, we can conclude:

- PD-1/PD-L1 showed promising results in other neoplasms, indicating disease progression and specific immunotherapy;
- the methylation status of target genes, such as STK31, is considered an oncogenic precursor and a risk marker to invasive neoplasia, even if it is not a real value for a biomarker;
- DNA-HPV already incorporated as a secondary screening test, which is a substantial tool to help clinic management for papillomavirus patients.

Risk evaluation is of critical significance to choose a therapeutic strategy for patients that face HPV infection. The aim is

to bring the best result to a specific patient, according to each clinical situation. Cervical cancer has a significant impact on women's lives, with many deaths related to this disease even with screening tests. Immunological knowledge must be deepened to bring efficient vigilance, a treatment with less morbidity and better survival.

Participation of each author

Newton Sergio de Carvalho: publication theme, review for sending the paper.

Maria da Graça Bicalho: publication theme, review for sending the paper.

Luciane Rocha Ernlund Pangracio: bibliographic review, writing of the text.

Danielle Betina de Oliveira Traesil: bibliographic review, writing of the text.

Funding

The present paper had no financial support.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

REFERENCES

1. Dasari S, Wudayagiri R, Valluru L. Cervical cancer: Biomarkers for diagnosis and treatment. *Clin Chim Acta*. 2015;445:7-11. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.03.005>
2. Rotelli-Martins CM, Carvalho NS, Naud P, Teixeira J, Borba P, Derchain S, et al. Prevalence of Human Papillomavirus Infection and Associated Risk Factors in Young Women in Brazil, Canada, and the United States: A Multicenter Cross-sectional Study. *Int J Gynecol Pathol*. 2011;30(2):173-84. <https://doi.org/10.1097/pgp.0b013e3181f38dfe>
3. Tota JE, Struyf F, Merikukka M, Gonzalez P, Kreimer AR, Bi D, et al. Evaluation of Type Replacement Following HPV16/18 Vaccination: Pooled Analysis of Two Randomized Trials. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109(7):djw300. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw300>
4. Teixeira JC, Maestri CA, Machado HDC, Zeferino LC, De Carvalho NS. Cervical Cancer Registered in Two Developed Regions from Brazil: Upper Limit of Reachable Results from Opportunistic Screening. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2018;40(6):347-53. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1660841>
5. Franciosi JR, Gelmini GF, Roxo VS, Carvalho NS, Bicalho MDG. Is there a role played by HLA-E, if any, in HPV immune evasion? *Scan J Immunol*. 2020;91(3):e12850. <https://doi.org/10.1111/sji.12850>
6. El-Zein M, Ramanakumar AV, Naud P, Rotelli-Martins CM, Carvalho NS, Borba PC, et al. Determinants of acquisition and clearance of human papillomavirus infection in previously unexposed young women. *Sex Transm Dis*. 2019;46(10):663-9. <https://doi.org/10.1097/STD.0000000000001053>
7. Von Lisingen R, De França PP, De Carvalho NS, Bicalho MDG. MICA and KLRK1 genes and their impact in cervical intraepithelial neoplasia development in the southern Brazilian population. *Human Immunol*. 2020;81(5):249-53. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.02.007>
8. Verlaet W, Snijders PJF, Novianti PW, Witting SM, De Strooper LMA, Trooskens G, et al. Genome-wide DNA Methylation Profiling Reveals Methylation Markers Associated with 3q Gain for Detection of Cervical Precancer and Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(14):3813-22. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-16-2641>

9. Chong GO, Lee YH, Han HS, Lee HJ, Park JY, Hong DG, et al. Prognostic value of pre-treatment human papilloma virus DNA status in cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2017;148(1):97-102. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.11.003>
10. Halle MK, Ojesina AI, Engerud H, Woie K, Tangen IL, Holst F, et al. Clinicopathologic and molecular markers in cervical carcinoma: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol.* 2017;217(4):432.E1-432.E17. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.05.068>
11. Termini L, Villa LL. Biomarcadores na Triagem do Câncer de Colo Uterino. *DST - J Bras Doenças Sex Transm.* 2008;20(2):125-31.
12. Liu C, Lu J, Tian H, Du W, Zhao L, Feng J, et al. Increased Expression of PD-L1 by Human Papillomavirus 16 E7 Oncoprotein Inhibits Anticancer Immunity. *Mol Med Rep.* 2017;15(3):1063-70. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6102>
13. Maestri CA, Nishihara R, Ramos GP, Mendes HW, Messias-Reason I, De Carvalho NS. Mannose-binding lectin does not act as a biomarker for the progression of preinvasive lesions of invasive cervical cancer. *Med Princ Pract.* 2018;26(6):530-4. <https://doi.org/10.1159/000485037>
14. Maestri CA, Nishihara R, Mendes HW, Jensenius J, Thiel S, Messias-Reason I, et al. MASP-1 and MASP-2 serum levels are associated with worse prognostic in cervical cancer progression. *Front Immunol.* 2018;9:2742. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02742>
15. Fonseca FV, Tomasich FD, Jung JE, Maestri CA, Carvalho NS. The role of P16ink4a and P53 immunostaining in predicting recurrence of HG-CIN after conization treatment. *Rev Col Bras Cir.* 2016;43(1):35-41. <https://dx.doi.org/10.1590/0100-69912016001008>
16. Valenti G, Vitale SG, Tropea A, Biondi A, Laganà AS. Tumor markers of uterine cervical cancer: a new scenario to guide surgical practice? *Updates Surg.* 2017;69:441-9. <https://doi.org/10.1007/s13304-017-0491-3>
17. Barron EV, Roman-Bassare E, Sánchez-Sandoval AL, Espinosa AM, Guardado-Estrada M, Medina I, et al. CDKN3 mRNA as a Biomarker for Survival and Therapeutic Target in Cervical Cancer. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137397>
18. Fiano V, Trevisan M, Fasanelli F, Grasso C, Marabese F, Bicalho MDG, et al. Methylation in host and viral genes as marker of aggressiveness in cervical lesions: Analysis in 543 unscreened women. *Gynecol Oncol.* 2018;151(2):319-26. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.08.031>
19. Yin F, Wang N, Bi XN, Yu X, Xu X-H, Wang Y-L, et al. Serine/threonine kinases 31(STK31) may be a novel cellular target gene for the HPV16 oncogene E7 with potential as a DNA hypomethylation biomarker in cervical cancer. *Virology J.* 2016;13:60. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0515-5>
20. Das P, Thomas A, Kannan S, Deodhar K, Shrivastava SK, Mahantshetty U, et al. Human papillomavirus (HPV) genome status & cervical cancer outcome – A retrospective study. *Indian J Med Res.* 2015;142(5):525-32. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.171276>
21. Huang Y, He Q, Xu K, Zhou J, Yin J, Li F, et al. A new marker based on risk stratification of human papillomavirus DNA and tumor size to predict survival of locally advanced cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2019;29:459-65. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2018-000095>

Address for correspondence
LUCIANE ROCHA ERNLUND PANGRACIO
 Universidade Federal do Paraná, Hospital de Clínicas,
 Laboratório de Imunogenética
 Rua Padre Camargo, 280, 1º andar – Alto da Glória
 Curitiba (PR), Brazil
 CEP: 80060-240
 E-mail: luciane.pangraccio@hc.ufpr.br

Received on: 12.01.2019
 Approved on: 12.30.2019

APÊNDICE I – GENÓTIPOS IDENTIFICADOS NOS CASOS NIC2 E NIC3 E NOS CONTROLES HPV (+) E HPV (-)

	GID	Genótipos KIR	Haplótipo A				Haplótipo B						Pseudogenes	Genes de moldura					Casos				Controles				
			2DL1	2DL3	3DL1	2DS4	2DL2	2DL5	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5		3DS1	2DP1	3DP1	2DL4	3DL2	3DL3	CIN2		CIN3		HPV+		HPV -	
																				n	%	n	%	n	%	n	%
1	1	AA	X	X	X	X							X	X	X	X	X	X	26	28,9	21	22,3	23	32,9	42	21,8	
2	180	AA	X		X	X							X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	2	2,86	0	0	
3	74	BB					X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	1	1,43	0	0	
4	2	AB	X	X	X	X		X	X				X	X	X	X	X	X	11	12,2	14	14,9	10	14,3	16	8,29	
5	3	AB	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	13	14,4	5	5,32	5	7,14	5	2,59	
6	4	AB	X	X	X	X	X			X			X	X	X	X	X	X	5	5,56	12	12,8	7	10	9	4,66	
7	5	AB	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X	6	6,67	10	10,6	6	8,57	4	2,07	
8	6	AB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	3	3,33	3	3,19	2	2,86	5	2,59	
9	7	AB	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	4	4,44	4	4,26	3	4,29	3	1,55	
10	8	AB	X	X	X	X		X	X				X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	1	1,43	4	2,07	
11	9	AB	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	0	0	3	3,19	0	0	1	0,52	
12	11	AB	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	1	1,11	1	1,06	0	0	1	0,52	
13	12	AB	X	X	X	X		X	X	X			X	X	X	X	X	X	0	0	1	1,06	0	0	0	0	
14	13	AB	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X	1	1,11	0	0	0	0	0	0	
15	16	AB	X	X	X	X			X				X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	2	1,04	
16	17	AB	X	X	X	X		X					X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	1	0,52	
17	18	AB	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	7	3,63	
18	19	AB	X	X	X	X	X						X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	8	4,15	
19	20	AB	X	X	X	X	X	X					X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	4	2,07	
20	21	AB	X	X	X	X	X	X		X			X	X	X	X	X	X	3	3,33	0	0	0	0	0	0	
21	23	AB	X	X	X	X							X	X	X	X	X	X	0	0	1	1,06	0	0	2	1,04	
22	24	AB	X	X	X	X	X	X		X			X	X	X	X	X	X	0	0	1	1,06	0	0	0	0	
23	25	AB	X	X	X	X	X	X	0	X			X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	1	0,52	
24	27	AB	X	X	X	X		X					X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	1	0,52	
25	28	AB	X	X	X	X		X	X				X	X	X	X	X	X	1	1,11	2	2,13	0	0	2	1,04	
26	30	AB	X	X	X	X		X					X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	1	0,52	
27	31	AB	X	X	X	X	X	X		X			X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	4	2,07	
28	32	AB	X	X	X	X		X					X	X	X	X	X	X	1	1,11	0	0	0	0	0	0	
29	33	AB	X	X	X	X		X	X				X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	1	0,52	
30	38	AB	X	X	X	X	X	X					X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	1	0,52	
31	44	AB	X	X	X	X	X			X			X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	2	1,04	
32	46	AB	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X	X	0	0	1	1,06	0	0	1	0,52	
33	51	AB	X	X	X	X	X	X					X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	9	4,66	
34	56	AB	X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	0	0	1	1,06	0	0	0	0	
35	58	AB	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	3	1,55	
36	61	AB	X	X	X	X	X	X					X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	1	0,52	
37	62	AB	X	X	X	X	X			X	X			X	X	X	X	X	1	1,11	0	0	0	0	1	0,52	
38	63	AB	X	X	X	X	X		X	X			X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	1	0,52	
39	64	AB	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	3	1,55	
40	68	AB	X	X			X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	0	0	1	1,06	2	2,86	1	0,52	
41	69	AB	X	X			X	X					X	X	X	X	X	X	2	2,22	3	3,19	0	0	2	1,04	
42	70	AB	X	X			X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	2	2,22	0	0	0	0	1	0,52	
43	71	AB	X		X	X	X	X		X	X			X	X	X	X	X	1	1,11	1	1,06	3	4,29	2	1,04	
44	72	AB			X	X	X			X				X	X	X	X	X	0	0	1	1,06	0	0	1	0,52	
45	73	AB	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0	0	1	1,06	0	0	2	1,04	
46	75	AB	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	1	1,43	0	0	
47	76	AB			X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	1	1,11	1	1,06	0	0	3	1,55	
48	81	AB	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	3	1,55	
49	89	AB	X		X	X	X			X				X	X	X	X	X	0	0	0	0	1	1,43	0	0	
50	90	AB	X		X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	2	2,22	1	1,06	0	0	1	0,52	
51	91	AB	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	0	0	1	1,06	0	0	0	0	
52	94	AB	X		X	X	X	X		X	X			X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	1	0,52	
53	106	AB			X	X	X	X	X	X			X		X	X	X	X	0	0	1	1,06	0	0	1	0,52	
54	112	AB	X		X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	1	1,11	0	0	0	0	0	0	
55	113	AB	X		X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	0	0	1	1,06	0	0	0	0	
56	118	AB	X		X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	1	0,52	
57	154	AB	X	X		X		X	X				X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	1	1,43	0	0	
58	193	AB	X	X	X	X	X						X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	1	0,52	
59	200	AB	X	X	X	X		X						X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	3	1,55	
60	205	AB	X	X	X	X			X				X	X	X	X	X	X	1	1,11	0	0	0	0	0	0	
61	228	AB	X		X	X	X	X		X			X	X	X	X	X	X	1	1,1	1	1,06	0	0	1	0,52	
62	260	AB	X	X	X	X				X				X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	5	2,59	
63	289	AB	X		X	X			X				X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	1	0,52	
64	294	AB	X	X			X	X	X				X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	1	0,52	
65	319	AB	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	1	0,52	
66	337	AB	X	X	X	X	X	X					X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	1	0,52	
67	339	AB	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	1	0,52	
68	361	AB	X	X	X	X	X	X		X	X			X	X	X	X	X									

