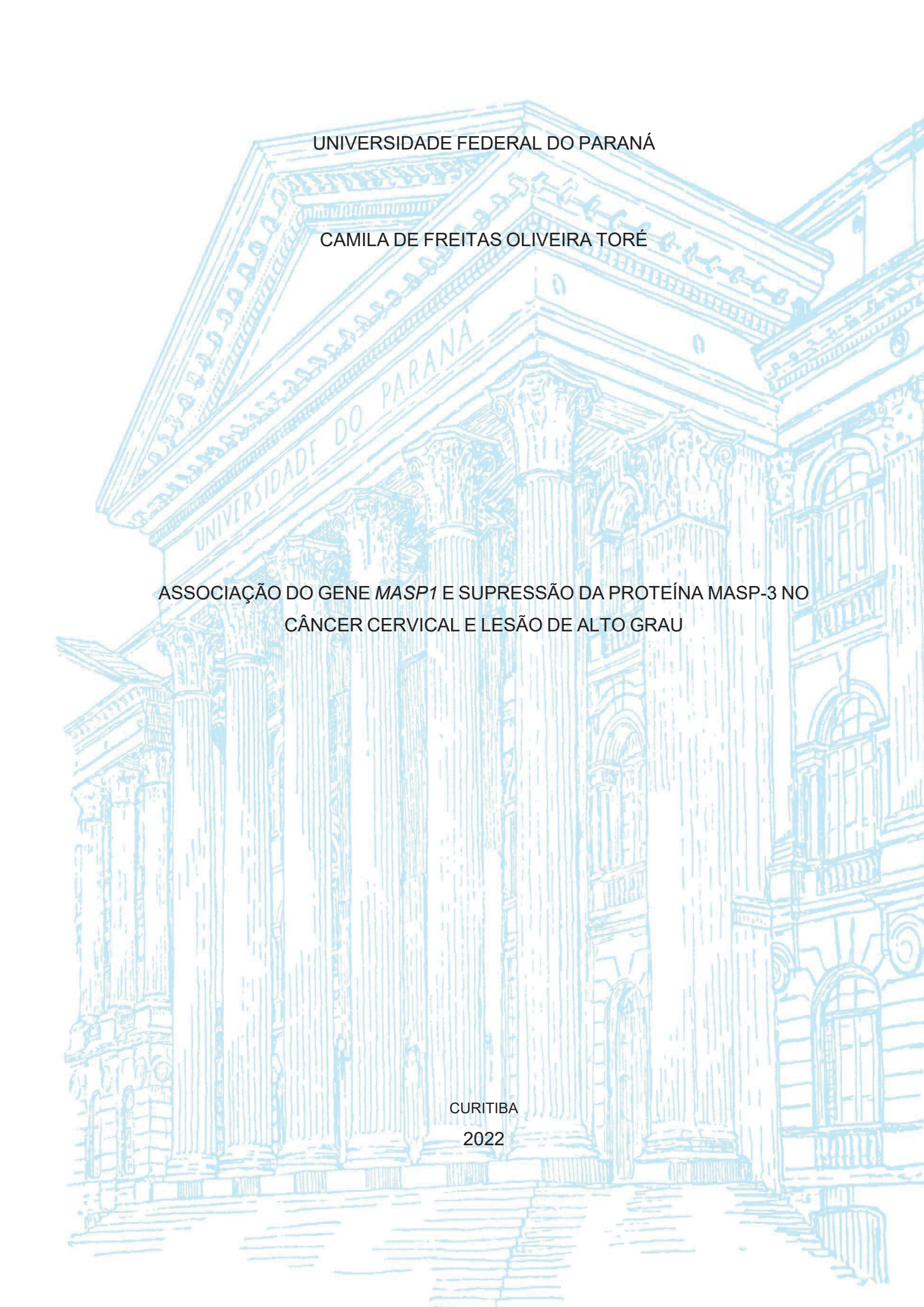




UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA DE FREITAS OLIVEIRA TORÉ

ASSOCIAÇÃO DO GENE *MASP1* E SUPRESSÃO DA PROTEÍNA MASP-3 NO
CÂNCER CERVICAL E LESÃO DE ALTO GRAU

CURITIBA
2022

CAMILA DE FREITAS OLIVEIRA TORÉ

ASSOCIAÇÃO DO GENE *MASP1* E SUPRESSÃO DA PROTEÍNA MASP-3 NO
CÂNCER CERVICAL E LESÃO DE ALTO GRAU

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

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Iara de Messias-Reason

Coorientador(a): Prof(a). Dr (a). Angelica Beate Winter Boldt

CURITIBA

2022

T678 Toré, Camila de Freitas Oliveira

Associação do gene masp1 e supressão da proteína masp-3 no câncer cervical e lesão de alto grau. [recurso eletrônico] / Camila de Freitas Oliveira. – Curitiba, 2023.

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

Orientadora: Profa. Dra. Iara de Messias Reason.

Coorientadora: Profa. Dra. Angelica Beate Winter Boldt

1. Serina Proteases Associadas a Proteína de Ligação a Manose. 2. Lectinas. 3. Neoplasias do Colo do Útero. I. Reason, Iara de Messias. II. Boldt, Angelica Beate Winter. III. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.



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

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CAMILA DE FREITAS OLIVEIRA TORÉ** intitulada: "**ASSOCIAÇÃO DO GENE MASP1 E SUPRESSÃO DA PROTEÍNA MASP-3 NO CÂNCER CERVICAL E LESÃO DE ALTO GRAU.**", sob orientação da Profa. Dra. IARA JOSE DE MESSIAS REASON, 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 doutora 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, 28 de Fevereiro de 2023.

Assinatura Eletrônica

07/03/2023 15:58:03.0

IARA JOSE DE MESSIAS REASON
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

07/03/2023 15:39:19.0

TAYLON FELIPE SILVA

Avaliador Externo (SINAI MEDICAL CENTER - LOS ANGELES, CA -
EUA)

Assinatura Eletrônica

07/03/2023 13:56:48.0

LUCIANA CONCI MACEDO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

Assinatura Eletrônica

07/03/2023 17:14:42.0

VALÉRIA BUMILLER BINI HOCH

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE GENÉTICA/UFPR)

Assinatura Eletrônica

06/03/2023 17:43:02.0

FERNANDA TOMIOTTO PELLISSIER

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA MEDICA, UFPR)

Rua General Cameiro, 181 - Prédio Central - 11º Andar - Curitiba - Paraná - Brasil

CEP 80060-150 - Tel: (41) 3360-1099 - E-mail: ppgmedicina@ufpr.br

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

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 263094

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.pppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 263094

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido a oportunidade de realizar esta pesquisa, pela força e bondade que teve comigo durante a minha caminhada acadêmica. Obrigada por ser a Luz que guia meus caminhos e a minha Fortaleza.

Ao meu marido Marcos pelo seu apoio, incentivo e paciência, ele sempre esteve ao meu lado me aconselhando em minhas decisões e me dando suporte para enfrentar os desafios. Obrigada por todo amor e cuidado dedicados a mim, serei eternamente grata.

À minha mãe Patricia, minha avó Rodecira e minha sogra Agda pelo apoio, amor, incentivo e pelos conselhos valiosos, vocês são mulheres inspiradoras. Serei eternamente grata.

À minha orientadora, professora Dr^a Iara de Messias-Reason, pela oportunidade de realizar este trabalho sob sua orientação, pela confiança depositada em mim, por todos os ensinamentos acadêmicos e de vida, pelas palavras de fé, e pelo acolhimento que carinhosamente a senhora oferece aos seus alunos.

À minha co-orientadora, professora Dr^a Angelica Winter Boldt, por todo carinho, pela confiança depositada em mim, por ter me acolhido e incentivado em momentos de dificuldade, pelas palavras de fé, pelas oportunidades que me ofereceu durante esses anos que trabalhamos juntas, pelo empenho em me ajudar em todos os momentos, pela amizade e por não ter desistido de mim. Serei eternamente grata.

À minha querida amiga Dra. Amarilis Giaretta de Moraes que mesmo de longe sempre esteve ao meu lado me incentivando, ajudando e apoiando. Serei eternamente grata.

À minhas amigas do Laboratório de Imunopatologia Molecular – UFPR/HC, Ma. Nathalia Sigorini, Helena Musetti Plácido, Dr^a. Pâmela Dias Fontana, Ma. Tatiane da Piedade Batista Godoy, Dr^a. Fabiana Antunes Andrade, Ma. Edneia Cavalcanti, Ma. Leia Sena, Dr^a. Vanessa Picceli, Dra. Lorena Bavia, pelo companheirismo, amizade, incentivo e por todos os dias que passamos juntas e pudemos trocar experiências e por tornar essa jornada mais leve e divertida.

Às minhas amigas Nathalia e Helena pelo apoio, incentivo, amizade e ajuda na realização deste trabalho, suas contribuições foram muito importantes e sou muito grata.

À minha querida amiga Ma. Leia Sena pelo apoio e amizade durante a realização deste trabalho.

À minha amiga Dr^a. Fernanda Berti pelo apoio, amizade, incentivo e parceria que fizemos durante esse trabalho.

Aos queridos Rosana e Júnior pelo carinho e gentileza com os quais sempre me receberam em sua casa em Curitiba.

Às pacientes, pela confiança depositada neste projeto.

Aos colaboradores deste projeto, sem eles esta pesquisa não teria sido possível.

A todos os envolvidos nas etapas desta pesquisa.

RESUMO

Introdução: O câncer do colo do útero (CC) é o quarto tipo de câncer mais comum em mulheres e para o ano de 2023 foram estimados 17.010 casos novos no Brasil, o que representa um risco considerado de 13,25 casos a cada 100 mil mulheres. O câncer é uma doença multifatorial e que envolve diferentes mecanismos celulares. Determinar perfis genéticos de suscetibilidade são de grande relevância para definições de tratamentos, diagnósticos e acompanhamento dos pacientes. A expressão diferencial das proteínas altamente expressas no colo uterino normal ou suprimidos em tecidos tumorais, como MASP-1 e MASP-3, respectivamente, pode ocorrer devido a interferência de nucleotídeos de polimorfismo único (SNPs) localizados em regiões regulatórias do gene *MASP1*, levando a alterações na taxa de expressão de transcritos e consequentemente na progressão do câncer. **Objetivos:** O objetivo desse estudo foi analisar a influência de SNPs presentes nas regiões reguladoras do gene *MASP1* em CC, lesões intraepiteliais cervicais de alto grau (NIC) e a progressão dessas NIC de alto grau para CC, bem como avaliar a quantificação da MASP-3 no tecido tumoral do CC. **Metodologias:** Nove polimorfismos das regiões reguladoras do gene *MASP1* (*rs13064994*, *rs13094773*, *rs7609662*, *rs698105*, *rs3864098*, *rs1108450*, *rs72549262*, *rs1109452* e *rs85031*) foram genotipados em 99 pacientes CC, 219 NIC de alto grau, 121 controles saudáveis e 129 doadoes de sangue, pela técnica de PCR-SSP multiplex. A imunohistoquímica foi realizada pela técnica *tissue microarray* (TMA) em amostras de colo uterino obtidas por biópsia de histerectomia embebida em parafina usando anticorpo primário anti-MASP-3. **Resultados:** Foi verificada uma associação significativa dos haplótipos de *MASP1* GTG_CCC_CCA (CC – OR:2,42, CI:1,14-5,14; NIC de alto grau – OR:18,66, IC:3,51-23,91) e GTG_CCA_CCG (CC – OR:4,39, CI:1,92- 9,99; NIC de alto grau – OR:30.24, IC:4.88-58.29) com CC e NIC de alto grau. A associação positiva do haplótipo GCG_CCC_CCG (OR:13,50, CI:4,92-26,71) com a progressão da NIC de alto grau para CC. O nível de expressão tecidual de MASP-3 no tecido tumoral foi significativamente menor que o tecido normal adjacente ($p=0,0013$). **Conclusão:** Os dados genéticos deste estudo sugerem que os mecanismos celulares afetados pelos haplótipos das regiões reguladoras de *MASP1* e do exon 12 podem ser considerados possíveis fatores para compreendermos a supressão da expressão de MASP-3 no

tecido tumoral de CC. As análises haplotípicas deste trabalho podem ser fatores de suscetibilidade para o CC e NIC de alto grau ou à progressão da NIC de alto grau para o CC.

Palavras-chave: Serina proteases associadas à lectina de ligação à manose. Via das lectinas. Supressor tumoral. Câncer ginecológico. Sistema Complemento.

ABSTRACT

Introduction: Cervical cancer (CC) is the fourth most common type of cancer in women and for the year 2023, were estimated 17,010 new cases in Brazil, which represents a considered risk of 13.25 cases per 100,000 women. Cancer is a multifactorial disease that involves different cellular mechanisms. Determining genetic susceptibility profiles is of great relevance for defining treatments, diagnoses and patient follow-up. Differential expression of highly expressed proteins in normal uterine cervix or suppressed in tumor tissues, such as MASP-1 and MASP-3, respectively, may occur due to interference of single polymorphism nucleotides (SNPs) located in regulatory regions of the *MASP1* gene, leading to alterations in the expression rate of transcripts and consequently in the progression of cancer. **Objectives:** The aim of this study was to analyze the influence of SNPs present in the regulatory regions of the *MASP1* gene in CC, high-grade cervical intraepithelial lesions (CIN) and the progression of these high-grade CIN to CC, as well as to evaluate the quantification of MASP-3 in the CC tumor tissue. **Methodologies:** Nine Polymorphisms of the regulatory regions of the *MASP1* gene were genotyped in 99 CC patients, 219 high grade CIN, 121 healthy controls and 129 blood donations (*rs13064994*, *rs13094773*, *rs7609662*, *rs698105*, *rs3864098*, *rs1108450*, *rs72549262*, *rs1109452* e *rs85031*), by the PCR-SSP multiplex technique. Was performed the tissue microarray immunohistochemistry (TMA) technique on cervical specimens provided by paraffin-embedded hysterectomy biopsy using anti-MASP-3 primary antibody. **Results:** A significant association of *MASP1* GTG_CCC_CCA haplotypes (CC – OR:2.42, CI:1.14-5.14; high-grade CIN – OR:18.66, CI:3.51-23.91) and GTG_CCA_CCG (CC – OR:4.39, CI:1.92-9.99; high-grade CIN – OR:30.24, CI:4.88-58.29) with CC and high-grade CIN. The positive association of the GCG_CCC_CCG haplotype (OR:13.50, CI:4.92-26.71) with progression from high-grade CIN to CC. The level of tissue expression of MASP-3 in tumor tissue was significantly lower than in adjacent normal tissue ($p=0.0013$). **Conclusion:** The genetic data of this study suggest that the cellular mechanisms affected by the haplotypes of the regulatory regions of *MASP1* and exon 12 can be considered possible factors for understanding the suppression of MASP-3 expression in CC tumor tissue. The haplotype analyzes of this work may be susceptibility factors for CC and high-grade CIN or the progression of high-grade CIN to CC.

Keywords: Mannose-binding lectin-associated serine proteases. Lectin pathway. Tumor suppressor. Gynecological cancer. Complement System.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	JUSTIFICATIVA.....	14
1.2	OBJETIVOS	14
1.2.1	Objetivo geral	14
1.2.2	Objetivos específicos.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC)	16
2.1.1	Patogênese da Neoplasia Intraepitelial Cervical.....	18
2.1.2	Progressão das Neoplasias Intraepiteliais Cervicais para Câncer Cervical ..	19
2.1.3	Prevalência e Incidência de Neoplasia Intraepitelial Cervical.....	19
2.1.4	Diagnóstico e classificação da NIC pela citologia.....	20
2.1.5	Diagnóstico e classificação da NIC pela histologia	20
2.1.6	Rastreamento das NICs.....	21
2.1.7	Tratamento das Neoplasias Intraepiteliais Cervicais	22
2.2	CANCER CERVICAL (CC).....	23
2.2.1	Prevalência e Incidência do Câncer Cervical	25
2.2.2	Classificação histológica do CC.....	26
2.2.3	Etiologia e fatores de risco do Câncer Cervical	27
2.2.4	Fisiopatologia do Câncer Cervical pelo HPV	28
2.2.5	Estadiamento clínico do carcinoma invasivo do colo uterino	29
2.2.6	Tratamentos para o câncer cervical	30
2.3	SISTEMA COMPLEMENTO	30
2.3.1	Visão geral do Sistema Complemento	30
2.3.2	Via das Lectinas.....	35
2.3.3	MASPs as enzimas chave da via das lectinas	37
2.3.4	Estrutura proteica das MASP-1 e MASP-3 e o gene <i>MASP1</i>	39
2.3.5	Expressão das proteínas MASP-1 e MASP-3 em tecidos normais e tumorais	
	43	
2.3.6	Papeis desempenhados pelas proteínas MASP-1 e MASP-3 fora da via das lectinas.....	45
2.3.7	Polimorfismos no gene <i>MASP1</i> e associação com doenças	48

2.3.8	Isoformas do gene <i>MASP1</i> no câncer	51
3	MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1	CASUÍSTICA	54
3.1.1	Pacientes com NIC de alto grau	55
3.1.2	Pacientes com Câncer Cervical	56
3.1.3	Grupo comparação.....	58
3.1.4	Grupo controle.....	58
3.2	COLETA DE SANGUE	58
3.3	EXTRAÇÃO DE DNA	59
3.4	SNPS DO GENE <i>MASP1</i>	59
3.4.1	TESTE DE HOMOGENEIDADE DAS AMOSTRAS	63
3.5	IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA MASP-3	63
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
4	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	65
4.1	ARTIGO 1- POLIMORFISMOS DO GENE <i>MASP1</i>	67
4.2	ARTIGO 2- IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA MASP-3 NO TECIDO TUMORAL DE CC	97
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
5.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	112
6	REFERÊNCIAS	113
7	ANEXOS	130
	ANEXO A	130
	ANEXO B	131

1 INTRODUÇÃO

O câncer de colo de útero ou cervical (CC) é o quarto tipo de câncer mais frequente em mulheres no mundo (WHO, 2022), e no Brasil, excluídos os de tumores de pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o terceiro tipo de câncer mais incidente entre mulheres (INCA, 2022). Para o ano de 2023 foram estimados 17.010 casos novos, o que representa um risco considerado de 13,25 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2022). A infecção persistente por genótipos oncogênicos de Papilomavírus humano (HPV) está associada ao desenvolvimento de lesões neoplásicas intraepiteliais cervicais (NICs), que são precursoras do CC (DERBI *et al.*, 2020; ONYANGO *et al.*, 2020). A incapacidade de criar uma resposta imune eficiente frente ao HPV resulta em uma infecção viral persistente, que leva ao desenvolvimento de uma inflamação crônica no local, e, como consequência, a probabilidade da progressão das NICs a carcinomas é aumentada. Somados a esses eventos os mecanismos de escape do vírus ao sistema imune do hospedeiro envolvem processos de supressão de vias imunológica e modulação gênica essenciais à sobrevivência e replicação viral, conferindo, desta maneira, a infecção por HPV um papel crucial na criação de um microambiente favorável ao desenvolvimento tumoral (BOSCH *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2017; DOORBAR *et al.*, 2012; MAESTRI *et al.*, 2018).

A evolução e o estabelecimento de um tumor são marcados pela aquisição de alterações genéticas (mutações no DNA) e epigenéticas (metilação de DNA e a acetilação de histonas), gerando uma assinatura antigênica diferencial entre as células malignas e as células normais. Durante esse processo de desenvolvimento tumoral, ocorre uma pressão seletiva no microambiente tumoral, em que o sistema imune do hospedeiro seleciona as células tumorais com maior resistência e que possibilita às células cancerígenas se evadirem dos mecanismos do sistema complemento (SC). Esta pressão seletiva leva a uma superexpressão de proteínas reguladoras do SC, como parte do mecanismo de escape do organismo ao tumor (F. QUAIL; J. TAYLOR; POSTOVIT, 2012; PIO; AJONA; LAMBRIS, 2013; REIS *et al.*, 2017; SPURGEON; LAMBERT, 2017).

As serinas proteases associadas à lectina ligante de manose (MASPs) são proteínas que têm papel crucial na via das lectinas (VL). A VL é uma das três vias de ativação do SC, ativada por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que estão associadas às MASPs, culminando na formação da C3 convertase, enzima comum às

três vias do SC (BOLDT *et al.*, 2018; DEGN *et al.*, 2010; DEGN; JENSENIUS; THIEL, 2011; DEGN; THIEL; JENSENIUS, 2007; DOBÓ *et al.*, 2016a; THIEL; JENSEN; DEGN, 2012).

MASP-1 inicia a VL através da formação de complexos com a lectina ligante de manose (MBL), ficolinas e colectinas, que se ligam a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), padrões moleculares associados a dano celular (DAMPs) e/ou padrões moleculares associados a células alteradas (ACAMPs). Após a formação do complexo o homodímero de MASP-1 se ativa e transativa a MASP-2 iniciando a cascata proteolítica (ANDRADE *et al.*, 2017; BOLDT *et al.*, 2018).

Em contrapartida, a MASP-3 tem papel de regulação da VL, pois compete com as proteínas MASP-1 e MASP-2 por sítios de ligação em colectinas e/ou ficolinas. Esta proteína também possui funções fora da VL, tais como a clivagem do pró-fator D em fator D na via alternativa (VA) (OROSZLÁN *et al.*, 2016) e a clivagem da proteína 5 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP-5), a qual possui papel crucial no controle, sobrevivência, diferenciação celular e apoptose (CORTESIO; JIANG, 2006).

As proteínas MASP-1 e MASP-3 são codificadas pelo gene *MASP1* (ENSG000000127241) por splicing alternativo (BOLDT *et al.*, 2018). O *mRNA* de MASP-1 e MASP-3 são altamente expressos pela cérvix uterina e (The Human Protein Atlas, 2022; DEGN *et al.*, 2009; GTEx Portal, 2022). Elevados níveis séricos de MASP-1 foram associados com a progressão do câncer cervical e pior prognóstico (MAESTRI *et al.*, 2018). Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) podem alterar a taxa de expressão das MASPs bem como a composição proteica dos domínios de MASP-1 e MASP-3, causando alterações nos papéis destas proteínas. Todavia, poucos polimorfismos em *MASP1* foram investigados até a presente data, e, nenhum SNP foi ainda avaliado com CC e NICs (MENDES *et al.*, 2020; BUMILLER-BINI *et al.*, 2018; CAVALCANTI *et al.*, 2022; GAJEK; ŚWIERZKO; CEDZYŃSKI, 2020)

Espera-se por meio desse estudo, ampliar o conhecimento sobre a progressão do câncer cervical, avaliando a associação de polimorfismos deste gene com a expressão dessas isoformas em amostras coletadas de mulheres com diagnóstico confirmado de câncer cervical e neoplasias intraepiteliais cervical de alto grau, bem como detectar possíveis biomarcadores dentre os produtos de *MASP1*, para avaliar o risco, diagnóstico e/ou prognóstico da doença. Estudos de associação entre fatores imunológicos e virais poderiam fornecer informações importantes para o

desenvolvimento de imuno terapêuticos e/ou imunomoduladores, que visam aumentar a resposta imune contra o HPV e melhorar a qualidade de vida das pacientes.

1.1 JUSTIFICATIVA

Embora o CC já tenha sido exaustivamente estudado, o exato mecanismo envolvido na fisiopatologia, progressão tumoral e desenvolvimento das NICs, ainda não foram completamente elucidados. Além disso, até o momento, não existe um marcador laboratorial capaz de identificar quais pacientes irão progredir para um CC e quais permanecerão apenas com as NICs. Portanto, é imprescindível a definição de grupos de riscos, passíveis de intervenção terapêutica precoce, bem como a identificação de elementos prognósticos e novas medidas terapêuticas em benefício dos milhões de pacientes com câncer cervical.

Considerando que o Brasil já conta com diretrizes de seguimento de mulheres em idades férteis (INCA, 2020), ter mais ferramentas que corroboram nesse diagnóstico precoce, seria de grande importância para a saúde pública, especialmente se apresentar grande acessibilidade às pacientes. Até a presente data, muito pouco se sabe sobre o papel das MASP-1 e MASP-3 na fisiopatologia e manutenção do câncer cervical e das lesões cervicais de alto grau. Diante disso, é importante um estudo que avalie a associação entre polimorfismos de nucleotídeo único no gene *MASP1* e a expressão da MASP-3 frente à diversidade genética e imunológica das pacientes.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) e os haplotipos do gene *MASP1* (ENSG000000127241) no desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais (NIC) de alto grau e do câncer cervical, bem como a expressão da proteína MASP-3 no tecido tumoral de pacientes com câncer cervical (CC).

1.2.2 Objetivos específicos

- Padronizar uma reação de PCR-SSP multiplex para os SNPs *rs13094773*, *rs698105*, *rs1108450* e o *rs3864098*, todos localizados em regiões intrônicas regulatórias de *MASP1*;
- Determinar as frequências alélicas e haplotípicas de 9 SNPs no gene *MASP1* e Investigar possíveis associações desses SNPs em mulheres com NIC de alto grau e com;
- Avaliar a expressão da MASP-3 no tecido tumoral de peças cirúrgicas de pacientes com câncer cervical e comparar com a expressão no tecido normal;
- Associar os dados funcionais dos SNPs alvos do gene, e sua implicação no desenvolvimento das NIC de alto grau e do câncer cervical.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC)

As NIC são lesões precursoras do CC que se caracterizam por serem lesões anormais, proliferativas e atípicas de graus variáveis que têm origem na zona de transformação da cérvix (BEDEL *et al.*, 2020), e são frequentemente assintomáticas. Essas lesões precursoras foram inicialmente descritas no início dos anos 1900 por Cullen e Rubin como achados histopatológicos casuais que tinham aspectos morfológicos semelhantes aos do tumor infiltrante, e que estavam contidas dentro do epitélio anormal (FONSECA, 2016). Entre 1925 e 1940 devido a dois novos procedimentos propedêuticos, a colposcopia e colpocitologia oncótica, essas lesões foram melhores caracterizadas (QUEIROZ *et al.*, 2006).

George Nicholas Papanicolaou, em 1920, ao estudar células do tecido vaginal e do colo uterino através da técnica de citologia esfoliativa, propôs uma classificação citológica dividida em cinco classes, que eram numeradas de I a IV, sendo a classe III sugestiva de malignidade mas não conclusiva para este diagnóstico, e a classe V como conclusiva para malignidade, esta classificação não considerava a possibilidade de lesões precursoras apenas a presença ou ausência de malignidade não sendo possível fazer correlação com dados histopatológicos (PAPANICOLAOU, 1954; RICHART, 1967). Em 1967 Ralph Richart ao estudar evolução natural do câncer cervical somado a dados de novos estudos prospectivos de ploidia de DNA, os quais mostravam que as classes de carcinoma *in situ* e displasia acentuada apresentavam relação histológica; sugeriu que as duas últimas classes propostas por Papanicolaou e Reagan, displasia acentuada e carcinoma *in situ*, fossem agrupadas em uma única classe e também mudou o termo displasias para NIC (FONSECA, 2016; REAGAN; HICKS, 1953; REAGAN; SEIDEMANN; SARACUSA, 1953; RICHART, 1973, 1990).

Posteriormente, com referência a intensidade dos distúrbios morfológicos celulares relacionados principalmente com a proliferação, atipia celular e mitoses, e o nível que alcançam na verticalidade do epitélio, as NIC foram histologicamente divididas em três graus: NIC I, NIC II e NIC III (AIDÉ *et al.*, 2009; QUEIROZ *et al.*, 2006). Em NIC I encontram-se atípicas celulares, localizadas no terço inferior do epitélio escamoso do colo uterino, já a NIC II ocorre nos dois terços inferiores e em NIC III há comprometimento de três terços do epitélio escamoso (AIDÉ *et al.*, 2009; QUEIROZ

et al., 2006). As NIC I, NIC II e NIC III por vezes podem ser consideradas como processos distintos, onde NIC I é autolimitada e evidencia a infecção pelo HPV (Papilomavírus Humano), enquanto NIC II e NIC III são consideradas lesões pré-malignas (QUEIROZ *et al.*, 2006).

Nos anos 80, um novo critério de classificação citológica cervical com uma terminologia uniforme surge para facilitar o manejo clínico das NICs, a nomenclatura de Bethesda, a qual sugere que a doença intraepitelial cervical não é um processo contínuo, mas sim um sistema de duas doenças descontínuas, criando o conceito de lesão intraepitelial escamosa que se divide em 2 grupos, o primeiro grupo é o de lesões intraepiteliais de baixo grau, LIEBG (lesão intraepitelial de baixo grau) ou LSIL (do inglês *low-grade intraepithelial lesion*) e o segundo de LEAG lesões intraepiteliais de alto grau ou HSIL (do inglês *high-grade squamous intraepithelial lesion*) (CARNS; FADARE, 2008; LUNDBERG, 1989; SOLOMON *et al.*, 2002).

Esta nova nomenclatura englobou no conceito de LIEBG dois grupos de alterações do colo uterino, as displasias de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US - do inglês *atypical squamous cells of undetermined significance*) e a NIC I, tendo em comum a associação à infecção pelo HPV. Além disso, os graus de NIC II e III foram agrupados em outro grupo chamado de lesões intraepiteliais escamosas de alto grau ou HSIL (*High Grade Squamous Intra-epithelial Lesion*) e as de células escamosas atípicas não podendo se excluir lesão de alto grau (ASC-H - do *Atypical Squamous Cells, Cannot Rule Out High Grade Squamous Intraepithelial Lesion*) (INCA, 2020; SOLOMON *et al.*, 2002; KAMAL *et al.*, 2022). As células escamosas atípicas (ASC) são células com anormalidades celulares e alterações reativas que não atendem aos critérios para neoplasia intraepitelial escamosa ou NIC (MARTINEZ, 2011; KAMAL *et al.* 2020).

A correlação entre lesões precursoras e câncer cervical (CC) foi realizada por Ostör em 1993 (OSTÖR, 1993). Ostör estudou a história natural de desenvolvimento de CC e achados laboratoriais que observavam os seguintes pontos: as NIC geralmente eram diagnosticadas uma década antes em pacientes de CC, mulheres com essas lesões desenvolviam câncer com maior frequência comparadas a mulheres sem elas, e os carcinomas em estágios precoces se desenvolviam na periferia da NIC ou na cripta das glândulas (FONSECA, 2016; OSTÖR, 1993). Por anos acreditava-se que havia uma linearidade na progressão das NIC, surgindo inicialmente como lesões iniciais classificadas como NIC I e ao evoluir chegavam ao

grau da NIC III, sendo possível ainda a evolução deste quadro para CC. Contudo, evidências indicam que não necessariamente o curso natural de progressão dos NIC e CC ocorra desta maneira, e em alguns casos o surgimento de NIC III ocorre sem relatos prévios de lesões de baixo grau (FONSECA, 2016; OSTÖR, 1993).

A infecção por genótipos de HPV de alto risco é um dos fatores de risco mais importantes associados ao desenvolvimento das NICs (CAUSIN *et al.*, 2021). Apesar da alta prevalência de HPV em mulheres sexualmente ativas, somente uma parte delas irá desenvolver NIC de alto grau, levantando a hipótese de que além da presença da infecção por HPV outros cofatores são peças chave para o desenvolvimento das NIC (AIDÉ *et al.*, 2009; CAUSIN *et al.*, 2021). Tais cofatores envolvem uma dinâmica equilibrada entre ambiente, características do HPV e a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro (AIDÉ *et al.*, 2009; FONSECA, 2016).

2.1.1 Fatores associados ao desenvolvimento da Neoplasia Intraepitelial Cervical

As lesões da NIC originam-se em células metaplásicas imaturas que sofrem alterações devido a uma multiplicidade de fatores, como os agentes oncogênicos. Dentre esses agentes estão, os subtipos de alto risco do HPV, as alterações fisiológicas, os fatores imunológicos e genéticos da paciente. Outros agentes oncogênicos considerados importantes são: a infecção por *Chlamydia trachomatis*, relação sexual precoce, múltiplos parceiros sexuais, multiparidade, uso prolongado de anticoncepcionais orais, tabagismo, baixo nível socioeconômico, abortos, deficiência de micronutrientes, dieta deficiente em vegetais e frutas (IARC, 1995; AIDÉ *et al.*, 2009).

A infecção por certos subtipos de HPV é apontada como agente etiológico das NIC e CC, estudos moleculares atribuíram o conceito de HPV de baixo risco oncogênico a lesões benignas, e HPV alto risco oncogênico a subtipos associados a lesões e câncer, o HPV 16 é o mais frequente na população afetando 50% das mulheres sexualmente ativas, além disso o HPV 16 é encontrado em 6,8% das mulheres com NIC 1, em 15,0% em NIC 2, e 44,5% em NIC 3, e os genótipos dos HPV 16, 31, 33 e 58 são os mais comuns em NIC 2/3 e câncer, e os HPV 39, 51, 53,

56, 66 e 68 foram mais comuns em NIC 1 e mulheres sem lesão, evidenciando que diferentes subtipos de HPV podem infectar uma mulher sexualmente ativa em diferentes momentos da sua vida (OSO et al., 2019).

2.1.2 Progressão das Neoplasias Intraepiteliais Cervicais para Câncer Cervical

De modo geral, as lesões precursoras têm curso evolutivo desigual e lento, podendo progredir, permanecer inalteradas ou regredir, e nesses contextos a presença de infecção por HPV ocorre de maneira transitória nas NIC, e possui uma resolução espontânea em mais de 80% das mulheres infectadas dentro de até 2 anos (FRANCESCHI; HERRERO; CLIFFORD, 2006; RICHART, 2001). Contudo, em mulheres que não possuem uma resposta imune efetiva contra o HPV e desenvolvem NIC, o grau de severidade é distinto de acordo com o tipo de lesão, mulheres que apresentam NIC I tem 57% de chance de sofrerem regressão espontânea, 32% de chance de persistência, 11% de chance de progressão para NIC III e somente 1% de chance para desenvolver CC; já em relação a NIC II há 43% de chance de regressão espontânea, 35% de chance de persistência, 22% de progressão para NIC III e de 3 a 5% de chance de progressão para o CC; e mulheres com NIC III apresentam somente 32% de chance de regressão espontânea, 56% de chance de persistência e mais de 12% de chance de evoluir para o câncer (FONSECA, 2016).

Além disso, observa-se risco elevado de progressão das lesões precursoras para CC em mulheres já tratadas. A taxa de incidência de CC após o tratamento de NIC é de 39 por 100.000 mulheres, tendo um risco três vezes maior quando comparadas às mulheres sem histórico de lesões precursoras e, um risco 10 vezes maior em mulheres com mais de 50 anos que possuem histórico de tratamento de NIC há pelo menos 20 anos (KALLIALA et al., 2020).

2.1.3 Prevalência e Incidência de Neoplasia Intraepitelial Cervical

Pouco é discutido na literatura sobre a incidência e prevalência das NICs no Brasil. Dados do período de 1998 a 1999 indicaram que a prevalência de NIC I era de 354/100.000 mulheres, de NIC II 255/100.000, NIC III 141/100.000 e para carcinoma invasivo de 24/100.000 (INCA, 2016). Além disso, de acordo com o Sistema de Informação do Controle do Câncer de Colo de Útero (SISCOLO) em 2009

no Brasil somente 0,2% dos exames de rastreamento indicaram HSLI, e neste mesmo período 1,4% do total de exames realizados indicou que 53,5% de todos os exames alterados indicaram ASC-H (INCA, 2016, BRASIL/MS/SISCOLO, 2010). Entretanto, a existência prévia ASC-H representa de 12,2% a 68% da ocorrência das lesões de alto grau e, de 1,3% a 3% de CC (INCA, 2016).

2.1.4 Diagnóstico e classificação da NIC pela citologia

O diagnóstico citológico das NIC chamada de colpocitologia oncótica ainda é o principal método de diagnóstico, e é realizado por exame microscópico das células cervicais em esfregaço citológico corado pela técnica de coloração Papanicolau. A avaliação citológica se baseia nas alterações nucleares e citoplasmáticas e frequentemente é de difícil leitura, pois o esfregaço cervical contém células com variedade de alterações, implicando em consideráveis desafios e subjetividade na leitura, e na demanda de pessoal altamente treinado (INCA, 2020).

Embora haja um grande impacto da colpocitologia em programas de rastreamento, esses métodos possuem muitas limitações, tais como, altas taxas de falsos-negativos, subjetividade no teste e a ampla variação de sensibilidade e especificidade entre diferentes laboratórios (FONSECA, 2016). As displasias observadas são caracterizadas pelo aumento do volume nuclear com variações no tamanho e forma celular. Núcleos anormais em células superficiais e intermediárias indicam uma NIC de baixo grau (NIC I), enquanto que anomalias em núcleos de células basais e parabasais indicam NIC de alto grau (NIC II e III). Além disso, a quantidade de citoplasma com relação ao tamanho do núcleo é uma característica importante para avaliar o grau das NICs (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2003).

2.1.5 Diagnóstico e classificação da NIC pela histologia

O diagnóstico final da NIC é estabelecido por meio do exame anatomopatológico de uma biópsia cervical, são consideradas as características histológicas relativas a diferenciação, maturação e estratificação das células, e anomalias nucleares. Desta maneira, a proporção da espessura das células do epitélio cervical com células maduras e diferenciadas é usada para classificar as NIC. Para o

diagnóstico histopatológico são consideradas anomalias nucleares, maior razão núcleo-citoplasma, hiperchromasia (aumento no volume da cromatina no núcleo), polimorfismo nuclear e anisocariose (variação do tamanho e da forma do núcleo). Frequentemente, pode-se observar uma correlação entre a proporção do epitélio com maturação e o grau de anomalia nuclear (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2003).

Em NIC I observa-se uma maturação com anomalias mínimas e pouca mitose, as células indiferenciadas ficam limitadas às camadas mais profundas do epitélio, e as alterações citopáticas devido a infecção pelo HPV são observadas na espessura total do epitélio. NIC II é caracterizada por alterações celulares displásicas, principalmente restritas à metade inferior ou os dois terços inferiores do epitélio, com anomalias nucleares mais acentuadas que na NIC I. E em NIC III as anomalias nucleares estendem-se por toda a espessura do epitélio, as mitoses têm formas anormais e a diferenciação e estratificação podem estar totalmente ausentes ou estarem presentes somente no quarto superficial do epitélio (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2003).

2.1.6 Rastreamento das NICs

O método atual de rastreamento do câncer do colo do útero no Brasil é o exame citopatológico, que deve ser oferecido às mulheres na faixa etária de 25 a 64 anos, que já tiveram atividade sexual. A priorização dessa faixa etária como a população-alvo do rastreamento justifica-se por ser a de maior ocorrência das lesões de alto grau (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2018 - <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/deteccao-precoce-do-cancer.pdf>)

No Brasil as mulheres são responsáveis por procurarem nos serviços de saúde o exame Papanicolaou, com a periodicidade indicada a cada 3 anos, contudo ainda não há um sistema de controle unificado para estes testes. Entretanto, de 20% a 25% dos exames realizados no país têm sido por mulheres fora do grupo etário recomendado e quase metade desses exames possuem intervalo menor de um ano, gerando dois grupos distintos, um de mulheres super rastreadas e outro de mulheres sem rastreamento (INCA, 2014).

O rastreamento correto da população alvo é um componente importante na atenção primária à saúde para se alcançar redução significativa na incidência e

mortalidade por CC. Contudo, devido ao desconforto físico e tabus envolvidos na realização deste exame, uma grande parte das mulheres sexualmente ativas deixam de realizá-lo dentro do período recomendado. Outro ponto a ser considerado, é o fato de que as mulheres que vivem em regiões menos povoadas e/ou menos desenvolvidas no Brasil possuem pouco ou nenhum acesso ao exame periódico, e quando raramente têm a chance de realizá-lo não o fazem, pois há questões pessoais e religiosas envolvidas. No Brasil, por meio do SUS, não há disponível ainda exames capazes de substituir o teste de Papanicolau ou a colposcopia, gerando uma demanda altamente relevante de novas metodologias ou técnicas eficazes no diagnóstico precoce das lesões precursoras e do CC, que possam ser amplamente adotadas como formas de rastreamento (FONSECA, 2016).

A rede pública de saúde somente oferece como exame de rastreamento o teste de Papanicolau. O teste de HPV oncogênico é um exame com potencial para contribuir na avaliação de mulheres com colposcopia insatisfatória sem alterações ou com achados colposcópicos menores, uma vez que a ausência de HPV oncogênico assegura a inexistência das NIC e CC, porém o sistema público de saúde não cobre a realização deste exame (BANDYOPADHYAY, 2008).

2.1.7 Tratamento das Neoplasias Intraepiteliais Cervicais

O tratamento das lesões precursoras pode prevenir a maioria dos cânceres do colo do útero, por isso, as mulheres sem acesso aos serviços efetivos de rastreamento e tratamento são as mais atingidas pela doença invasiva (INCA, 2021).

Para mulheres diagnosticadas com NIC I ou lesão de baixo grau, a recomendação é a repetição do exame citopatológico em seis meses, se a citologia de repetição for negativa em dois exames consecutivos, a paciente deve retornar à rotina de rastreamento citológico trienal, mas se uma das citologias subsequentes no período de um ano for positiva, essa paciente deve ser encaminhada à unidade de referência para colposcopia, caso essa colposcopia indicar achados anormais do colo do útero deve-se realizar a biópsia. Se o resultado da biópsia indicar NIC II/III ou câncer, deve-se seguir uma conduta específica, porém se for NIC I a paciente deverá ser mantida em seguimento citológico. Devido a elevada taxa de resolução de NIC I a conduta médica recomendada é apenas de seguimento e observação, sem qualquer intervenção terapêutica (INCA, 2016).

O manejo adequado de pacientes com NIC II/III ou lesões de alto grau é de extrema importância devido ao risco envolvido de progressão dessas lesões para o câncer cervical, mas além disto há também uma grande preocupação com o tratamento envolvido para não aumentar riscos ao futuro reprodutivo destas pacientes. No Brasil, os métodos para a abordagem dessas lesões são os excisionais, pois permitem ao mesmo tempo diagnosticar os casos de invasão não detectados pela citologia ou pela colposcopia, e também servem de tratamento (INCA, 2016). A exérese da zona de transformação ou EZT (em inglês LLETZ – *Large loop excision of the transformation zone* ou LEEP – *Loop electrosurgical excision procedure*) ou cirurgia de alta frequência (CAF) está indicado para doença ectocervical. Entretanto, a decisão sobre qual método terapêutico a ser utilizado deve levar em conta a idade e paridade da paciente, desejo gestacional futuro, histórico de tratamento prévios, avaliação de risco e experiência médica (FONSECA, 2016).

As diretrizes brasileiras preconizam que jovens menores de 20 anos portadoras de NIC II e colposcopia satisfatória possam ser tratadas apenas de maneira observacional, já para pacientes com NIC III deve ser uma conduta ativa e não observacional dando-se preferência aos métodos excisionais como terapia primária (THOMAS et al., 2016).

2.2 CANCER CERVICAL (CC)

O câncer de colo do útero ou câncer cervical (CC) pode ser caracterizado por uma replicação desordenada do epitélio de revestimento do colo uterino, comprometendo o estroma e podendo invadir estruturas anexas (INCA, 2022). Fisiologicamente, o colo do útero atua como uma barreira seletiva entre a cavidade endometrial estéril e a vagina carregada de patógenos, impedindo a passagem deles. Como consequência de seu papel funcional na reprodução, a grande maioria das patologias do colo do útero é uma consequência direta de doenças sexualmente transmissíveis. As infecções por diferentes patógenos são responsáveis pela maioria das lesões inflamatórias e do câncer do colo do útero (FELIX; WRIGHT; AMEZCUA, 2009).

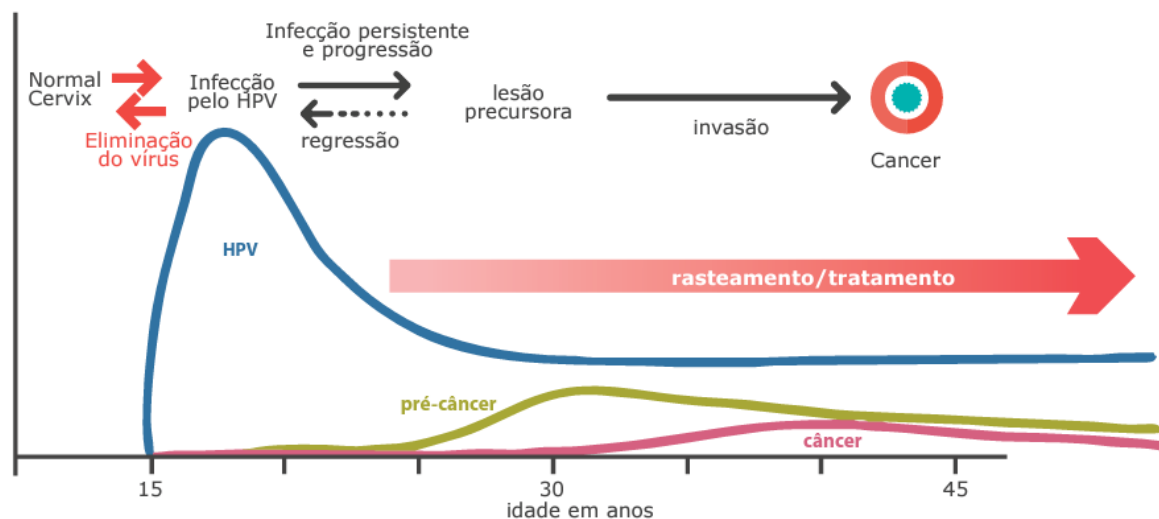
O colo do útero é formado por duas partes e é coberto por dois tipos diferentes de células, a endocérvice e a exocérvice ou ectocérvice. A endocérvice é a abertura do colo que leva ao útero, esta região é coberta por células glandulares, já a

ectocérvice é a parte mais externa do colo e, é coberta por células escamosas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). O local onde esses dois tipos celulares se encontram no colo é chamado de zona de transformação, o local exato desta zona pode mudar de acordo com a idade da mulher e/ou número de partos, e a maioria dos CC começam nas células da zona de transformação (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

O CC tem início com o desenvolvimento de uma lesão anormal na zona de transformação da cérvix a qual pode demorar de 10 a 20 anos para progredir para o câncer, contudo, devido a fatores imunológicos, genéticos e socioambientais da paciente o câncer pode ter uma progressão mais rápida (AINA *et al.*, 2021). Esta doença possui desenvolvimento lento, podendo não causar sintomas na fase inicial e evoluir para quadros de sangramento vaginal intermitente ou após a relação sexual, secreção vaginal anormal e dor abdominal associada a queixas urinárias ou intestinais em casos mais avançados (INCA, 2021).

A história natural do câncer cervical, compreende um período de desenvolvimento de 10 a 20 anos e envolve múltiplos passos cruciais, incluindo as infecções persistentes por genótipos de HPV de alto risco, a contribuição de fatores sociocomportamentais, a predisposição genética e a resposta imune da paciente (INCA, 2021). A infecção pelo HPV ocorre em torno dos 15 a 20 anos, porém as lesões precursoras de câncer têm o pico em torno dos 30 anos e a incidência do CC aumenta nas mulheres a partir dos 35 anos e atinge seu pico na quinta ou sexta décadas de vida. Assim, antes dos 25 anos, prevalecem as infecções por HPV e lesões de baixo grau que regredirão espontaneamente na maioria dos casos, ou lesões de alto grau que apresentam significativa taxa de regressão espontânea nesse grupo etário. (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016) (FIGURA 1).

FIGURA 1. HISTÓRIA NATURAL DO CÂNCER CERVICAL.



FONTE: INCA, 2021.

LEGENDA: Mulheres entre 15 e 20 anos ao entrarem em contato com HPV de alto risco (linha azul) desenvolve uma infecção local na cérvix uterina. Contudo, esta infecção pode sofrer regressão espontânea e a cérvix volta a ser normal. Já as precursoras de câncer (linha amarela) têm o pico em torno dos 30 anos e a incidência desse câncer aumenta nas mulheres a partir dos 35 anos. A maioria das lesões de baixo grau resolve-se espontaneamente, entretanto, algumas lesões pode progredir para lesões de alto grau e/ou câncer cervical (linha rosa) com o passar dos anos.

2.2.1 Prevalência e Incidência do Câncer Cervical

O CC é o quarto câncer mais frequente em mulheres no mundo, com estimativa de 847.000 novos casos até 2040 e de 524.000 mortes (WHO, 2022; IARC, 2023). Devido à pandemia de COVID-19 em 2020-2021 os dados de estimativas de CC para 2023 ainda não foram atualizados e disponibilizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS). (STELZLE *et al.*, 2021). Segundo a *International Agency for Research in Cancer* (IARC) para o período de 2022 a 2040 são estimados 24,5 milhões de novos casos e de 13.600 mortes por CC no Brasil (WHO, 2022; IARC, 2023).

No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o terceiro tipo de câncer mais incidente entre as mulheres. Para o ano de 2023 foram estimados 17.010 casos novos, o que representa uma taxa ajustada de incidência de 13,25 casos a cada 100.000 mulheres (INCA, 2022). Na análise regional, o câncer do colo do útero é o segundo mais incidente nas regiões Norte (20,48/100.000) e Nordeste (17,59/100.000) e o terceiro na Centro-Oeste (16,66/100.000). Já na região Sul (14,55/100.000) ocupa a quarta posição e, na região Sudeste (12,93/100.000), a quinta posição (INCA, 2022). A taxa de mortalidade por câncer do colo do útero, ajustada pela população mundial, foi de 4,60 óbitos/100.000 mulheres, em 2020 (INCA, 2020).

2.2.2 Classificação histológica do CC

O câncer cervical é classificado de acordo com sua caracterização histopatológica ao microscópio em dois grupos principais, carcinoma de células escamosas (CCE) e o adenocarcinoma seguindo a classificação de 2014 da OMS para tumores dos órgãos reprodutivos femininos. De maneira geral, as lesões do adenocarcinoma não são tão facilmente detectadas no exame citológico como são as lesões escamosas (FELIX; WRIGHT; AMEZCUA, 2009).

O CCE é o tipo mais frequente, chegando a 75% dos casos, esse tipo histológico se desenvolve a partir do epitélio metaplásico da ectocérvice, e geralmente se inicia na zona de transformação. O adenocarcinoma é o menos comum, perfaz de 20-25% do CC, e se desenvolve a partir de células glandulares produtoras de muco da endocérvice (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020; ÁYEN; MARTÍNEZ; BOULAIZ, 2020; INCA, 2022). Ainda podem existir cânceres cervicais que apresentam características tanto de células escamosas como de adenocarcinomas, porém eles são muito raros, e são chamados de carcinomas adenoescamosos ou carcinomas mistos.

2.2.3 Etiologia e fatores de risco do Câncer Cervical

Estima-se que 99,7% dos CC têm seu gatilho com esta infecção viral, sendo que 70-75% dos casos de CC são causados por infecções por genótipos de HPV de alto risco, que são HPV-16 e HPV-18 (ALEMANY *et al.*, 2010; CROSBIE *et al.*, 2013; WHO, 2022). A maioria das mulheres infectadas pelo HPV não desenvolvem CC devido ao êxito no controle imunológico da resposta ao vírus, em média 10% das lesões precursoras relacionadas à infecção pelo HPV no colo uterino progridem para carcinoma *in situ* e 1% para carcinoma invasor (FONSECA *et al.*, 2016; SHULZHENKO *et al.*, 2014). Contudo, uma menor proporção de mulheres com CC é negativa para os genótipos oncogênicos de HPV, sinalizando que fatores genéticos e imunológicos também contribuem para o desenvolvimento do CC. Estima-se que de 5,5% a 11% dos CC em todo o mundo sejam HPV-negativos (XING *et al.*, 2021), porém apenas alguns tipos de CC são realmente HPV-negativos (BURK *et al.*, 2017; PIROG *et al.*, 2014, 2018; STOLNICU *et al.*, 2017).

O carcinoma de células escamosas é raramente HPV-negativo (PIROG, 2017), já de 15 a 38% dos adenocarcinomas cervicais são HPV-negativos (ALEMANY *et al.*, 2010; CLIFFORD *et al.*, 2003; HOLL *et al.*, 2015), e a positividade para HPV em carcinoma *in situ* variam de acordo com suas características histológicas (JENKINS *et al.*, 2020). Um estudo recente na Espanha mostrou que 10% dos tumores cervicais são negativos para HPV, sendo do tipo não escamoso e com coloração p16 negativa, outro achado relevante é que os tumores HPV-negativos encontram-se nos estágios mais avançados da classificação da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), apresentam metástases linfonodais levando a uma pior sobrevida dessas pacientes, sugerindo que uma baixa porcentagem dos CC tem origem em vias independentes do HPV (OLAWAIYE *et al.*, 2021). Todavia, esses dados devem ser considerados com cautela, devido a influência de outros fatores que atuam na identificação correta de HPV em alguns casos de CC, como por exemplo, em pacientes com CC e idade avançada a negatividade ao HPV (JENKINS *et al.*, 2020; XING *et al.*, 2021), ou a técnica utilizada para identificar o HPV, falsos negativos podem ser devido a diferença significativa entre os métodos de detecção de HPV, além disso, qualidade da amostra coletada também podem levar a resultados falso-negativos (TJALMA; DEPUYDT, 2013; XING *et al.*, 2021). Nesse sentido, o mecanismo exato do CC independente da infecção por HPV ainda não está claro, mas

é possível que o CC nesses casos seja causado por mutações em genes associados ao tumor ou envolva a participação de outras vias celulares, tais como PI3K-AKT, p-AKT e p-mTOR as quais já foram identificadas em outros tipos de cânceres ginecológicos (PIROG, 2017; UENO *et al.*, 2013; XING *et al.*, 2021).

Outros fatores de risco associados ao desenvolvimento do CC incluem contribuintes comportamentais também, além do infeccioso já mencionado. A atividade sexual e o estilo de vida influenciam no risco de CC, o início da atividade sexual muito jovem ou próximo a menarca aumenta o risco de CC, a primeira relação sexual antes dos 18 anos aumenta o risco de CC em duas vezes, e múltiplos parceiros sexuais triplica esses riscos (FRUMOVITZ *et al.*, 2005).

A paridade é outro fator de risco significativo, gravidez antes dos 18 anos e/ou a multiparidade elevam os riscos de infecção por HPV e desenvolvimento do CC (MCGRAW; FERRANTE, 2014; VESCO *et al.*, 2011). O tabagismo dobra o risco de ocorrência de CC quando comparados a não fumantes, pois os subprodutos do tabaco destroem o DNA de células do colo uterino (COLLINS *et al.*, 2010). O uso prolongado de contraceptivos orais aumenta o risco em 1,9 vezes para cada 5 anos de uso do medicamento (VESCO *et al.*, 2011). Doenças sexualmente transmissíveis como clamídia, herpes e HIV contribuem para o desenvolvimento do CC (VESCO *et al.*, 2011). Além disso, mulheres já tratadas com NICs têm risco de 2 a 3 vezes maiores de desenvolver câncer cervical (FONSECA, 2016; KALLIALA *et al.*, 2020).

2.2.4 Fisiopatologia do Câncer Cervical pelo HPV

A patogênese da infecção pelo HPV envolve a superexpressão de oncoproteínas virais (E6 e E7), que visam inibir uma variedade de proteínas celulares supressoras de tumor (p53 e retinoblastona-pRb) e afetam processos biológicos celulares essenciais, como os mecanismos de reparo do DNA e apoptose, ativando os principais *hallmarks* do câncer, levando as alterações celulares do hospedeiro que induzem a carcinogênese na cérvix uterina (BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2019).

Aproximadamente 12% dos cânceres humanos no mundo são causados por infecções virais, sendo o HPV responsável por 5% deles (MESRI; FEITELSON;

MUNGER, 2014). A oncogênese viral humana apresenta traços comuns: as oncoviroses são necessárias, mas não suficientes para o desenvolvimento de tumores, o câncer viral aparece no contexto de infecção persistente e ocorre muitos anos após a infecção aguda, e o sistema imune pode desempenhar papel deletério ou protetor, pois alguns tumores associados aos vírus progridem com a imunossupressão e outros se desenvolvem no contexto da inflamação crônica (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

O HPV pertence à família *Papillomaviridae* a qual possui vírus epiteliotrópicos não envelopados com genomas de DNA circular de fita dupla de 8 kB (SZYMONOWICZ, 2020). O grupo de HPVs de alto risco infectam especificamente células epiteliais da mucosa do colo uterino e dentro deste grupo os genótipos mais comuns associados ao câncer cervical são HPV 16 e HPV 18, em contrapartida os HPVs de baixo risco causam lesões genitais benignas sendo os mais frequentes os HPV 6 e HPV 11 as células epiteliais basais infectados por HPV apresentam epissomas de baixo número de cópia, e a amplificação do genoma viral, a expressão gênica tardia e a síntese da progênie viral estão confinadas às camadas diferenciadas terminais do epitélio infectado (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; MCLAUGHLIN-DRUBIN; MEYERS; MUNGER, 2012; MOODY; LAIMINS, 2010).

2.2.5 Estadiamento clínico do carcinoma invasivo do colo uterino

O carcinoma do colo do útero é um tumor clinicamente estadiado. A Classificação da Federação Internacional de Ginecologistas e Obstetras (FIGO) divide os tumores invasivos em quatro estágios: I, II, III e IV (OLAWAIYE *et al.*, 2021). Este critério foi revisado em 2018 e agora permite incluir achados de imagem e patológicos, quando disponíveis, para atribuir o estágio. O estágio I inclui todos os tumores confinados ao colo do útero e é subdividido em estágios IA1, IA2, e IB. Os tumores de estágio II se estendem além do colo do útero até os dois terços superiores da vagina (estágio IIA) ou no paramétrio, mas não na parede lateral pélvica (estágio IIB). Estágio III tumores se estendem para o terço inferior da vagina (estágio IIIA) ou envolver a parede lateral pélvica ou causa hidronefrose ou rim não funcionante (estágio IIIB).

Tumores de estágio IV se estendem além da pelve verdadeira ou envolvem a mucosa da bexiga ou reto (OLAWAIYE *et al.*, 2021).

2.2.6 Tratamentos para o câncer cervical

O adequado tratamento para o CC inclui cirurgia ou radioterapia ou a combinação de ambos, além disso ele irá variar de acordo com o grau de estadiamento, tamanho do tumor e fatores pessoais, como idade e desejo de preservação da fertilidade (INCA, 2020). Nos estádios iniciais do câncer, os tratamentos cirúrgicos conservadores, como a conização, podem ser considerados. Para lesões invasivas pequenas, menores do que 2 cm, devem ser consideradas as cirurgias mais conservadoras, evitando-se assim as complicações e morbidades provocadas por cirurgias mais radicais (INCA, 2020).

Para o diagnóstico de carcinoma microinvasor no estágio IA1 a histerectomia é considerada o procedimento padrão, mas há possibilidade de conização se houver desejo futuro gestacional (INCA, 2016). No estadiamento IA2, existe consenso de que a histerectomia radical modificada com linfadenectomia pélvica é o tratamento mais adequado, pois as metástases para linfonodos, contudo, quando há o desejo de engravidar é recomendado a traquelectomia radical com linfadenectomia pélvica. Para os estádios IB2 e IIA volumosos (lesões maiores do que 4cm), IIB, IIIA, IIIB e IVA, as evidências científicas atuais orientam para tratamento combinado de radioterapia com quimioterapia, e posterior braquiterapia (INCA, 2020).

2.3 SISTEMA COMPLEMENTO

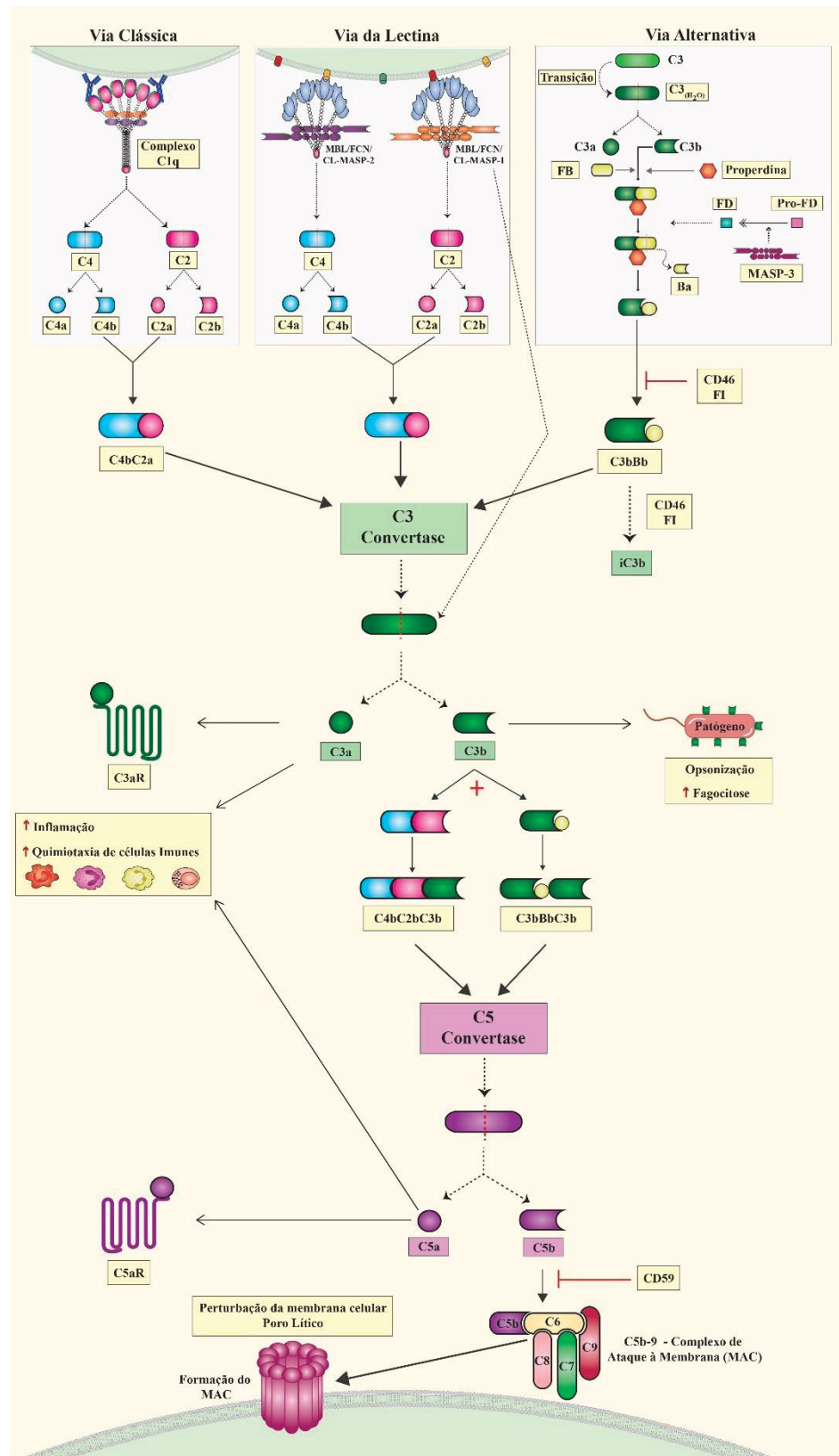
2.3.1 Visão geral do sistema complemento

O sistema complemento (SC) compreende um diversificado conjunto de proteínas solúveis e ligadas à membrana, cofatores, e proteínas reguladoras que se engajam em diferentes mecanismos biológicos da imunidade inata, para fornecer ao organismo uma linha primária de defesa imune (ANDRADE *et al.*, 2017; REIS *et al.*, 2017). O SC foi descrito pela primeira vez nos anos de 1890 como uma proteína que complementava a ação dos anticorpos contra infecção bacteriana, e durante muitos

anos acreditava-se que ele era um sistema da imunidade inata que não apresentava especificidade imunológica, porém atualmente já está bem estabelecido na literatura que o mesmo apresenta especificidade imunológica pois possui diversas moléculas capazes de reconhecer e discriminar com alta eficiência diferentes patógenos e o que é próprio do não próprio (FUJITA, 2002; FUJITA; ENDO; NONAKA, 2004; FUJITA; MATSUSHITA; ENDO, 2004). (FIGURA 2).

A rede de proteínas do SC desempenha um papel na inflamação, regeneração tecidual, angiogênese, tumorigênese, vigilância imunológica, opsonização e lise celular, citotoxicidade mediada por células, recrutamento de células imunes, ativação da cascata de coagulação e regulação de vias intracelulares (as vias não convencionais do SC) (ANDRADE *et al.*, 2017; REIS *et al.*, 2017). Além disso, o SC conecta a resposta imune inata e adaptativa, atuando como uma ponte de informações e/ou sinalizações para vários outros eventos imunológicos (DUNKELBERGER; SONG, 2010; MERLE *et al.*, 2015a, 2015b).

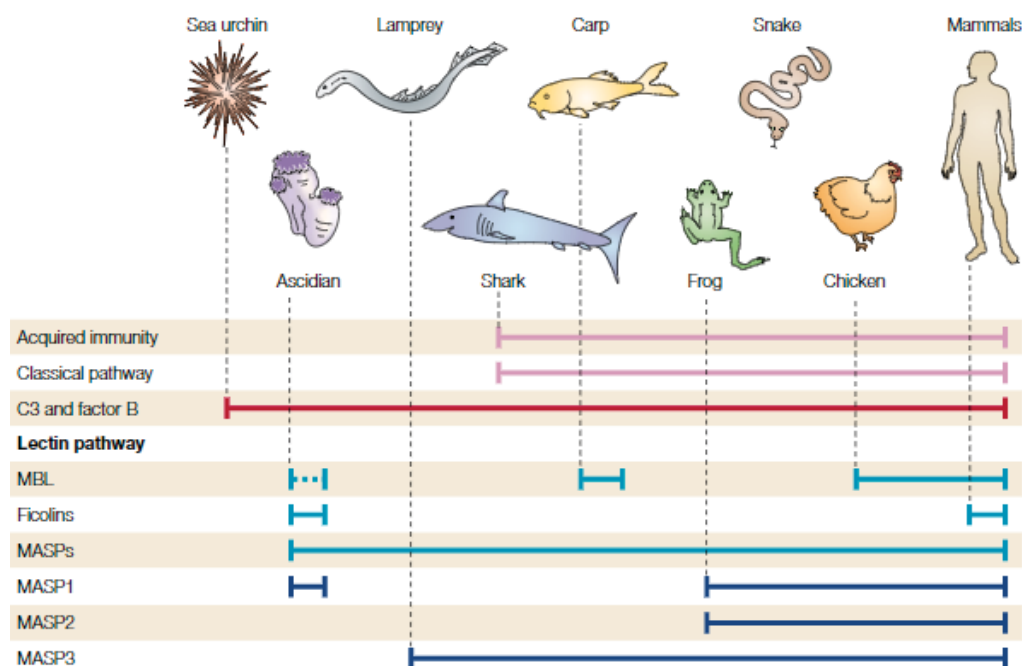
FIGURA 2. VISÃO GERAL DAS VIAS DO SISTEMA COMPLEMENTO.



FONTE: AUTOR (2023)

No cenário evolutivo, o SC surge nos metazoários como um combinado de proteínas que ainda não desempenhavam funções efetoras, primitivamente o SC contava com C3, fator B, uma lectina e uma serina protease associada a lectina. Já do grupo dos deuterostômios até vertebrados com mandíbula foram estabelecidas a maioria das combinações dos domínios proteicos específicos do complemento, surgindo as funções efetoras de cada componente individual, e após o surgimento dos vertebrados com maxilares ocorre aquisição de novos componentes do complemento devido, provavelmente, a duplicação de genes preexistentes do complemento, dando início ao SC moderno como conhecemos hoje em dia (FIGURA 3) (FUJITA, 2002; FUJITA; ENDO; NONAKA, 2004; NONAKA, 2014).

FIGURA 3. PERSPECTIVA EVOLUTIVA DO SISTEMA COMPLEMENTO



FONTE: FUJITA (2002)

LEGENDA: O sistema complemento surge no estágio inicial da evolução dos vertebrados com mandíbula, os estudos evolutivos revelaram que os tubarões e vertebrados superiores têm um sistema complemento bem desenvolvido com as três vias, embora nem todos os componentes de cada via tenham sido identificados. MBL: lectina ligante de manose, MASP: serinas proteases associadas à MBL, *Lectin*

pathway: Via das lectinas, *Classical pathway*: Via clássica, *Ficolins*: ficolinas, *Factor B*: fator B, C3: componente C3.

Sendo um mediador crucial da imunovigilância tecidual, o SC responde rapidamente aos sinais de estresse molecular por meio de uma cascata de reações proteolíticas sequenciais, iniciadas através da ligação de moléculas de reconhecimento de padrões (PRMs) a estruturas distintas em células danificadas, superfícies de biomateriais ou patógenos. As moléculas C1q, lectina ligante a manose (MBL), as serinas proteases associadas à MBL (MASPs), ficolinas, colectinas e a properdina (também conhecido como Fator P) são as principais PRMs do SC. Na literatura há três vias de ativação do complemento bem estudadas e descritas, são elas a vias clássica (VC), alternativa (VA) e a das lectinas (VL), entretanto, crescentes evidências indicam que o complemento pode ser ativado por outras vias dependendo dos gatilhos de iniciação e do microambiente ou contexto fisiopatológico (REIS *et al.*, 2018).

Embora a ativação do complemento se inicie por diferentes gatilhos, todas as três vias convergem na formação da C3 convertase, uma enzima central da cascata proteolítica. A ativação da VC ocorre por meio da ligação do complexo C1q-C1r/C1s a anticorpos solúveis ou ligados à superfície celular, essa ligação leva à clivagem das moléculas solúveis do complemento C2 e C4 pelas serinas proteases C1r e C1s gerando os fragmentos C2a e C2b, C4a e C4b, respectivamente (ANDRADE *et al.*, 2017; REIS *et al.*, 2017). A VL é ativada quando um dos seus PRMs (MBL, ficolinas e/ou colectinas) reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), associados a danos (DAMPs) ou padrões moleculares associados a células alteradas (ACAMPs).

A ligação das MASP-1 e MASP-2 ao MBL, ficolina ou colectinas ocorre após esse reconhecimento inicial e culmina na clivagem de C2 e C4 nos seus fragmentos. Essas duas vias formam o complexo C2aC4b que é a C3 convertase. A VA é continuamente ativada em baixos níveis pela hidrólise espontânea do C3_(H2O) uma proteína abundante no soro, gerando os fragmentos C3a e C3b, o fragmento C3b se liga ao Fator B (FB) e formam C3bFB ao qual a properdina se liga dando maior estabilidade ao complexo, pois fornece um ponto focal para a ancoragem do C3bBb às membranas celulares (RICKLIN *et al.*, 2016) (FIGURA 2). A porção do FB do

complexo C3bFB é clivado, em Ba e Bb pelo Fator D (FD), e o fragmento Bb permanece ligado ao C3b e formam a C3 convertase da via alternativa (C3bBb) (ANDRADE *et al.*, 2017; REIS *et al.*, 2017).

Após a formação da C3 convertase (C2aC4b ou C3bBb), que cliva C3 circulante em C3a e C3b, a cascata proteolítica converge para a via lítica final. O fragmento C3a é uma anafilatoxina que pode se ligar ao seu receptor celular C3aR, influenciando diversos processos imunológicos pró-inflamatórios e a quimiotaxia de células imunes. O fragmento C3b dá continuidade à cascata ao ligar as C3 convertases geradas pelas vias do complemento, levando à formação de C5 convertase que cliva a molécula de C5 em C5a e C5b. C5a é uma potente anafilatoxina com vários papéis biológicos, assim como o fragmento C3a. Por outro lado o fragmento C5b liga-se as moléculas de C6, C7, C8 e C9 formando o complexo de ataque à membrana C5b-9 (MAC), que desempenha um importante papel nas membranas celulares causando poros líticos (ANDRADE *et al.*, 2017; REIS *et al.*, 2017).

Uma vez que o complemento é ativado não há um ponto de retorno, portanto, os reguladores do complemento solúveis e associados à membrana desempenham papéis cruciais inibindo ou retardando a cascata proteolítica. Entre os reguladores de complemento destacamos as moléculas MASP-3 e MAp44 as quais inibem a ativação de VL; as proteínas de membrana CD46 e CD55 e o fator I (FI) que terão ação inibitória na formação da C3 convertase da VA; a proteína reguladora de membrana CD59 que atua impedindo o estágio final de polimerização do MAC, e o fator H (FH) que se liga ao fragmento C3b e facilita a sua degradação enzimática atuando de maneira importante para impedir a formação da via final do complemento (REIS *et al.*, 2017).

2.3.2 Via das Lectinas

A iniciação da VL depende do reconhecimento específico de PAMPs, DAMPs ou ACAMPs pelo complexo formado por PRMs evolutivamente antigos e as MASPs. Os PRMs da VL têm capacidade de reconhecer de maneira específica diferentes carboidratos ou resíduos acetilados da superfície celular (ALI *et al.*, 2012; BELTRAME

et al., 2015). Os PRMs da VL são estruturalmente semelhantes e podem ser classificados em duas famílias: a família das colectinas que incluem a lectina ligante de manose (MBL), colectina 10 (CL-10 ou CL-L1) e a colectina 11 (CL-11 ou CL-K1), e família das ficolinas que é composta pelas ficolina 1, ficolina 2 e a ficolina 3 (ŚWIERZKO; CEDZYŃSKI, 2020).

Tanto as colectinas como as ficolinas após sua ligação aos seus alvos nas superfícies celulares possuem capacidade de se associarem às MASP-1 e MASP-2 levando a ativação da VL. Os complexos MBL/ficolinas/CL-11-MASPs possuem capacidade proteolítica conhecida por três fragmentos do complemento: C2, C4 e C3. O complexo de MBL/ficolinas/CL-11-MASP-1 possui capacidade de clivar as moléculas C2 e C3, enquanto que o MBL/ficolinas/CL-11-MASP-2 cliva tanto C2 como C4 (RICKLIN *et al*, 2016). Entretanto, a ligação da MASP-3 a MBL/ficolinas/CL-11 leva a regulação negativa da VL através da competição pelo sítio de ligação aos PRMs com as MASP-1 e MASP-2, de maneira análoga a ligação das MBL/ficolinas/CL-11 a proteínas truncada, sem a capacidade proteolítica, MAP44 também regula a ativação da VL (BOLDT *et al*, 2018). A clivagem de C2 e C4 pelos diferentes complexos da VL geram os fragmentos C2a, C2b, C4a e C4b, respectivamente, os quais se combinam e formam a C3 convertase (C4bC2a) dessa via do complemento. A C3 convertase cliva o componente C3 em C3a e C3b, como foi discutido no tópico anterior, o fragmento C3b dará continuidade a cascata do complemento ao formar a C5 convertase e assim iniciará a via terminal do complemento; já o C3a participa de processo inflamatórios e quimiotaxia de células imunes. A clivagem de C3 pelo complexo lectinas/MASP-1 não pode ser considerada como ativação da VL, uma vez que esse processo não é exclusivo da VL, mas um processo central do complemento para o qual as três vias convergem independente do seu gatilho de ativação.

Os complexos formados pelas lectinas e as MASPs é composto por homodímeros de MASPs, lectinas/MASP-1/MASP-1 ou lectinas/MASP-2/MASP-2 ou lectinas/MASP-3/MASP-3. Heterodímeros de MASPs nesses complexos, até o momento, somente foram observados *in vitro* (BELTRAME *et al.*, 2015; DEGN; JENSENIUS; THIEL, 2014). Além da maneira usual de ativar a VL, comentada acima, a cascata proteolítica pode se iniciar através da ativação cruzada entre MASP-1/MASP-2, que ocorre dentro de co-complexos compostos por homodímero aMASP-1, homodímero aMASP-2 e um pentâmero ou oligômero de lectinas, ou por

agrupamento e justaposição de complexos lectinas/MASP-1 e lectinas/MASP-2 em superfícies de ligantes, onde as lectinas podem não ser idênticas (DEGN; JENSENIUS; THIEL, 2014)

A VL pode ser considerada a via original do SC do ponto de vista evolutivo, pois esta via não requer a participação da imunidade adquirida, além disso evidências indicam que o SC se originou como um sistema de opsonização por lectinas (FUJITA; MATSUSHITA; ENDO, 2004). A VL surge no filo Urochordata, nas ascídias, com as lectinas Ficolinas e GBL, uma molécula homóloga ao MBL, e com a MASP-1. A MASP-3 surge no filo Chordata, nas lampreias, e a MASP-2 é a última das MASPs a surgir na filogenia, aparecendo somente nos anfíbios (FUJITA, 2002; FUJITA; ENDO; NONAKA, 2004; FUJITA; MATSUSHITA; ENDO, 2004) (FIGURA 3).

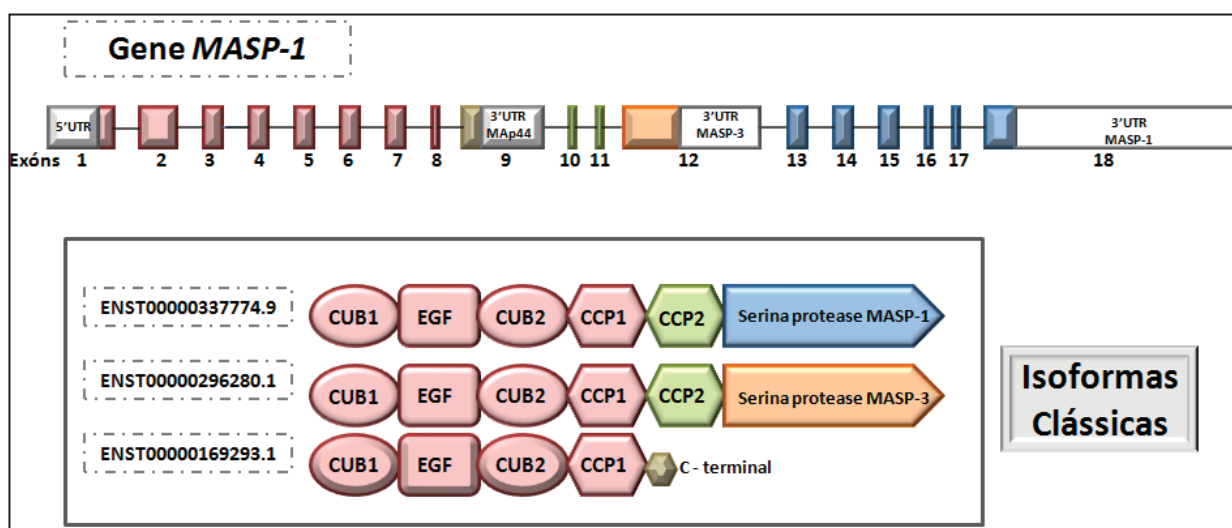
2.3.3 MASPs as enzimas chave da via das lectinas

Os componentes da VL foram descritos a pouco tempo na história da ciência, desta maneira novas funções e papéis ainda estão sendo descobertos. A primeira observação das MASPs foi realizada em 1987 onde essa proteína foi descrita como um componente de ativação do fator reativo Ra bactericida de camundongo (RaRF) (IKEDA *et al.*, 1987). Em 1992, cinco anos após a primeira observação, Matsushita e Fujita (1992) identificaram a MASP-1 complexada com o MBL no soro humano (MATSUSHITA; FUJITA, 1992), e em 1997 a segunda MASP, a MASP-2, foi identificada por Thiel (1997) (THIEL, 1997). Há 21 anos a MASP-3 foi identificada como a terceira serina protease (DAHL *et al.*, 2001). Na VL as lectinas ficam responsáveis por reconhecer os padrões conservados em superfícies celulares e as MASPs são as responsáveis por ativar enzimaticamente outros componentes da cascata do complemento.

Há alguns anos pensava-se que a MASP-2 fosse a enzima central da VL, mas dados mais recentes colocam a MASP-1 como a principal (BOLDT *et al.*, 2016). Evidências de que a VL é ativada através da autoativação da MASP-1 alterou a maneira de olhar o papel desta enzima dentro do complemento. Além disso, a MASP-1 é uma proteína com muitas funções fisiológicas importantes fora do complemento, as quais serão discutidas no tópico seguinte (BOLDT *et al.*, 2016).

As MASPs são proteínas membros da superfamília das serina-proteases cuja função fisiológica principal é atuar como enzimas proteolíticas responsáveis pela ativação da VL, exceto as MASP-3 e MAP-44 (FUJITA, 2002). Dados de alinhamento de sequências indicam que as MASPs e as serinas proteases C1r e C1s da VC são da mesma família (YONGQING *et al.*, 2013). Proteínas dessas famílias possuem uma tríade His/Ser/Asp conservadas e compartilham a mesma ordem dos primeiros 5 domínios, CUB1-EGF-CUB2-CCP1-CCP2 formando a cadeia A, ligados ao domínio SP (cadeia B) por uma pequena região de ligação (YONGQING *et al.*, 2013). As proteínas MAP19 e MAP44 não possuem essa mesma sequência de domínios proteicos, a MAP19 possui somente os domínios CUB1 e EGF, e a MAP44 possui CUB1-EGF-CUB2-CCP1 (BOLDT *et al.*, 2016) (FIGURA 4). As MASPs podem ser encontradas com diferentes concentrações no soro ou plasma, níveis normais de MASP-1 é em torno de 11 microg/mL, o que é 20 vezes maior que a MASP-2 (THIEL; JENSEN; DEGN, 2012), já de MASP-2 é de 400-500 ng/mL (MØLLER-KRISTENSEN *et al.*, 2003; YTTING, 2008), e os níveis de MASP-3 são intermediários, com concentração média de 5,2-6,4 microg/mL (DEGN *et al.*, 2010; SKJOEDT *et al.*, 2010b).

FIGURA 4. DOMÍNIO DAS PROTEÍNAS MASP-1, MASP-3 E MAP44.



FONTE: O Autor (2022).

LEGENDA: As proteínas MASPs representadas nas figuras são produtos do gene *MASP1*. As cores dos exons são correspondentes as cores dos domínios proteicos

que codificam em cada proteína. O transcrito ENST00000337774.9 corresponde a proteínas MASP-1, o ENST0000029280.1 corresponde a proteína MASP-3 e o ENST00000169293.1 a proteína MASP-4.

As MASPs séricas circulam em uma forma inativa da enzima, os zimógenos ou proenzimas, os quais somente são ativados após formarem complexos com as lectinas (ANDRADE *et al.*, 2017; BOLDT *et al.*, 2018). MASP-1 possui capacidade de se autoativar, e uma vez que esta proteína é ativada ela pode ativar a MASP-2 e possivelmente a MASP-3 (DOBÓ *et al.*, 2016A, BOLDT *et al.*, 2016).

A MASP-2 possui igualmente capacidade de auto ativação, contudo, a taxa de autoativação de MASP-1 é 300 vezes maior quando comparado a taxa da MASP-2 e é 140 vezes mais rápida (MEGYERI *et al.*, 2013). A ativação dos zimógenos das MASPs parece ocorrer através da ativação cruzada que provavelmente acontece devido ao agrupamento e justaposição de complexos lectina/MASP-1 e lectina/MASP-2 nas superfícies celulares (DEGN; JENSENIUS; THIEL, 2014). A MASP-1 ativada gera 60% de todo C2a necessário para a formação da C3 (C2aC4b) convertase da VL (BOLDT *et al.*, 2016). Uma vez que a MASP-2 já se encontra ativada ela se torna um potente ativador tanto de outros zimógenos de MASP-2 como de MASP-1 (DEGN; JENSENIUS; THIEL, 2014).

2.3.4 Estrutura proteica das MASP-1 e MASP-3 e o gene *MASP1*

As proteínas MASP-1 e MASP-3 são secretadas como cadeias simples de proenzimas (zimógenos), e se tornam ativadas através da clivagem do peptídeo de ativação (ligação Arg/Ile), levando a mudanças conformacionais e gerando duas cadeias polipeptídicas, cadeia A e B, ligadas por pontes de dissulfeto (THIEL, 2007). A cadeia A (cadeia pesada) compreende os 5 primeiros domínios que são o N-terminal CUB1 (*C1r/C1s/Uefg/bone morphogenetic protein 1*), o domínio EGF (*epidermal growth factor*), o CUB2 e dois domínios CCP (*control complement protein*), CCP1 e CCP2, respectivamente (BOLDT *et al.*, 2016). Já a cadeia B (cadeia leve), é formada somente pelo domínio SP (serine protease) (BOLDT *et al.*, 2016) (FIGURA 4). Os

domínios CUB1-EFG-CUB2 são os responsáveis pela dimerização e formação dos complexos com as lectinas (GÁL *et al.*, 2009), e os domínios CUB1-EGF são responsáveis pela homodimerização de duas cadeias de MASPs (GÁL *et al.*, 2009), tanto a homodimerização das MASPs como o processo de formação dos complexos lectina/MASPs ocorrem de maneira dependente de Ca^{2+} (GÁL *et al.*, 2009).

O gene *MASP1* (ENSG00000127241) codifica por splicing alternativo as proteínas já descritas MASP-1 e a MASP-3, e a MAp44 que é uma proteína truncada (proteína que não possui o domínio serina protease) (ENSEMBL, 2022; SAITO *et al.*, 2019; TAKADA *et al.*, 1995). Esse gene está localizado na fita reversa no braço longo do cromossomo humano 3, 3q27-q28 e possui uma fita com 5276 nucleotídeos e 18 exons. O gene codifica 15 transcritos primários através de sítios de splicing mutuamente exclusivos localizados entre os exons 8 e 13 (DEGN *et al.*, 2009), e dos 15 transcritos somente 8 corresponde a proteínas traduzidas (ENSEMBL, 2022; GTEx Portal, 2022; The Human Protein Atlas, 2022).

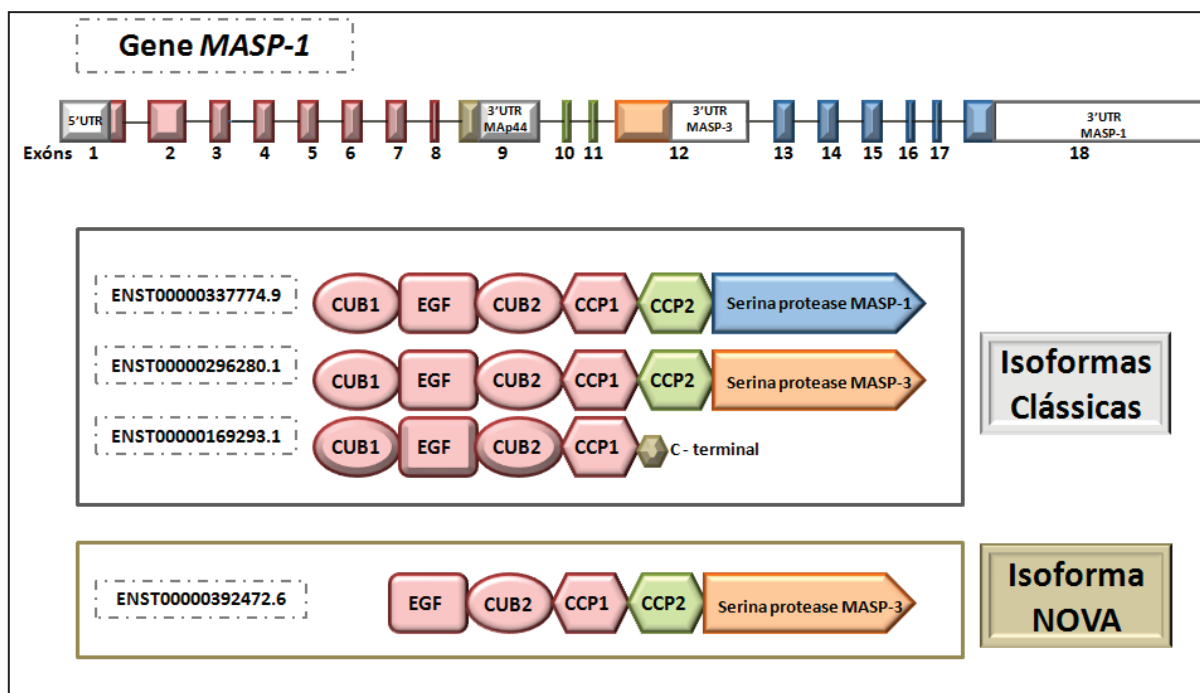
Os exons de 1 ao 9 codificam os domínios CUB1-EGF-CUB2-CCP1-CCP2, porém o domínio SP é único para cada uma das MASPs, e é codificado pelo exon 12 na MASP-3, e pelos exons de 13 ao 18 na MASP-1 (FIGURA 5). Ao contrário das MASP-1 e MASP-3 a MAp44 não apresenta os domínios CCP2 nem o SP, mas tem um domínio C-terminal codificado pelo exon 9 (DAHL *et al.*, 2001; DEGN *et al.*, 2009; SKJOEDT *et al.*, 2010a).

Há 8 transcritos que correspondem às proteínas MASPs geradas por este gene, dentre esses, destacamos 4 que correspondem às MASP-1, MASP-3, MAp44 e uma outra proteína MASP, ainda pouco conhecida.

O transcrito ENST00000337774.9 corresponde a isoforma 3 ou 203 ou MASP-1 tem 4994 pb e 16 exons, sua proteína apresenta 699 aminoácidos e 79.2 kDa (P484740-1), o transcrito ENST00000296280.11 corresponde a isoforma 2 ou 202 ou MASP-3 tem 3894 pb e 11 exons, sua proteína apresenta 728 aminoácidos e 81.9 kDa (P484740-2), e o transcrito ENST00000169293.10 corresponde a isoforma 1 ou 201 ou MAp44 tem 2440 pb e 9 exons, a sua proteína 380 aminoácidos e 43.6 kDa (P484740-3) (BOLDT *et al.*, 2016; ENSEMBL, 2022; GTEx Portal, 2022; The Human Protein Atlas, 2022).

O transcrito ENST00000392472.6 corresponde a isoforma 5 ou 205 com 3900 pb e sua proteína com 615 aminoácidos e 68.9 kDa (P48740-4) e até o momento não temos dados sobre sua função fisiológica (ENSEMBL, 2022; UNIPROT, 2022).

FIGURA 5. EXONS DO GENE *MASP1* E SEUS RESPECTIVOS DOMÍNIOS PROTEICOS EXPRESSOS.

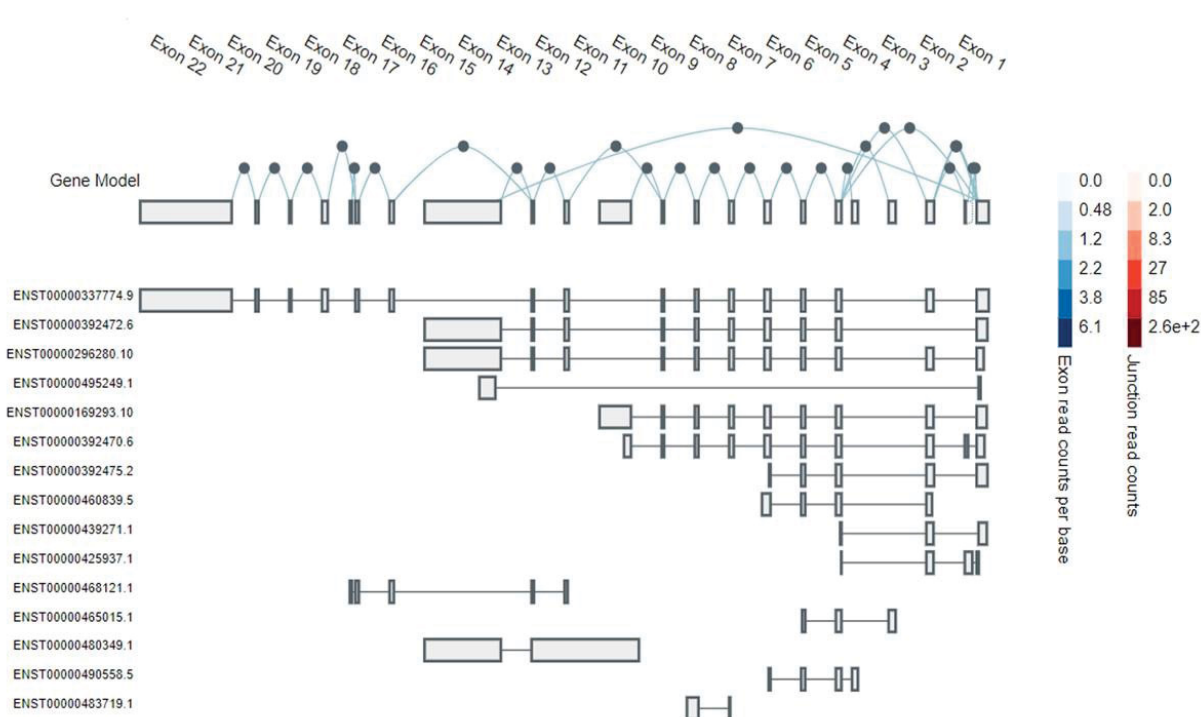


FONTE: O Autor (2023).

Degn (2011) sugeriram que este transcrito não fosse um mRNA funcional, pois seria degradado pela via de decaimento de mRNA mediada por mutações sem sentido (NMD), e seu papel poderia ser de um produto regulador de splicing ou apenas um produto residual gerado (DEGN; JENSENIUS; THIEL, 2011). Entretanto, dados mais recentes de bancos de dados nos indicam que esse transcrito pode apresentar papel importante em células tumorais (GTEx Portal, 2022; The Human Protein Atlas, 2022). Essa isoforma é idêntica ao mRNA da MASP-3, exceto pela exclusão do exon 2 (FIGURAS 6 e 7), levando à ausência do domínio CUB1 na proteína e de 113 aminoácidos referentes a sequência codificadora do peptídeo sinal da proteína, portanto, ao contrário da MASP-3 já descrita, esta nova proteína pode ser predita como uma proteína intracelular (The Human Protein Atlas, 2022) (FIGURA 7). No

presente trabalho, este transcrito será denominado “MASP-3 intracelular”, como descrito pelo The Human Protein Atlas (2022).

FIGURA 6. EXPRESSÃO DOS EXONS NOS TRANSCRITOS DE *MASP1*.

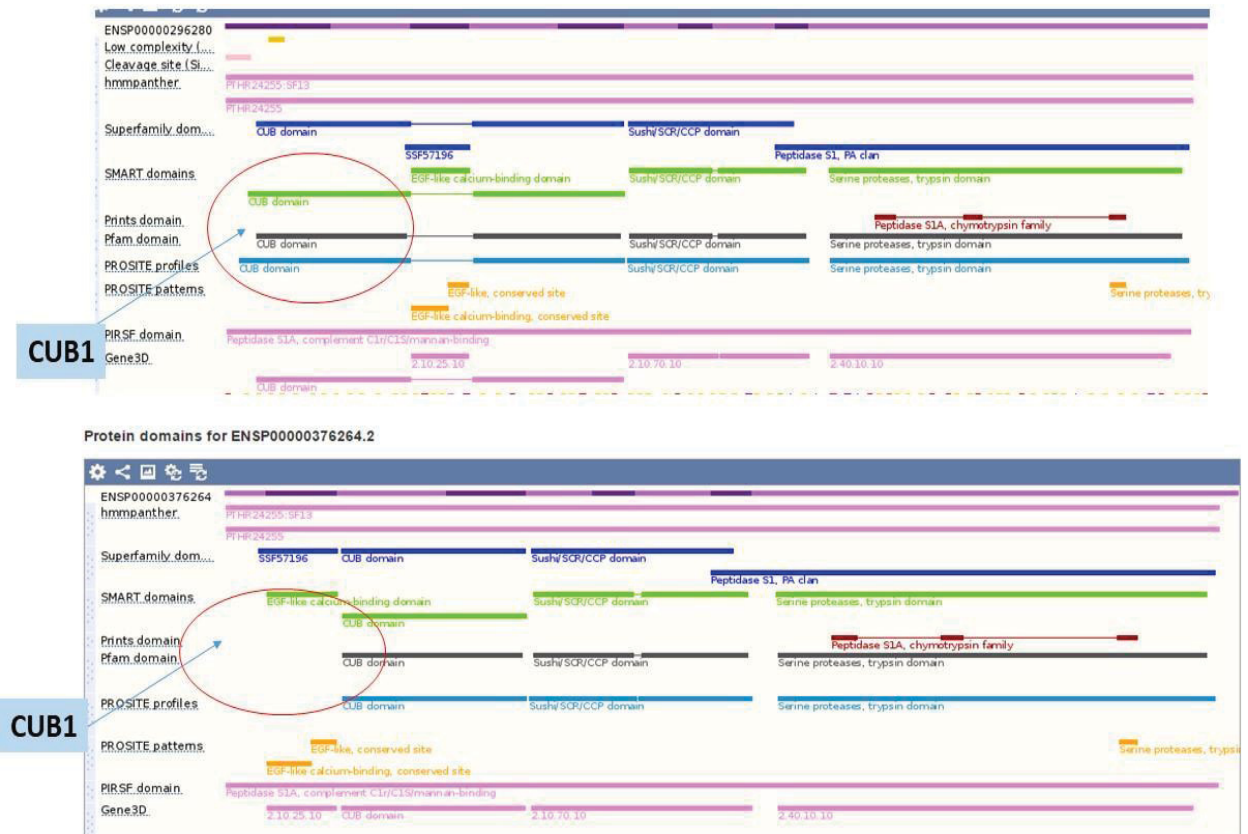


FONTE: Adaptado do GTEx dataset (2022).

LEGENDA: A figura mostra quais exons são expressos em cada um dos transcritos de *MASP1*. O ENST337774.9 corresponde a proteína MASP-1, o ENST296280.1 a proteína MASP-3 clássica e o ENST ao transcrito da MASP-3 ainda não caracterizada. Disponível em: < <https://gtexportal.org/home/gene/MASP1#gene-transcript-browser-block>>.

Até o momento, a MASP-3 intracelular ainda não foi observada pelos pesquisadores, pois ela não forma homodímeros e nem de formar complexos com as lectinas, dado que as técnicas usadas para isolar as MASPs o fazem devido a estas propriedades.

FIGURA 7. DOMÍNIOS PROTEICOS DOS TRANSCRITOS ENST392472.6 E ENST296280.1.

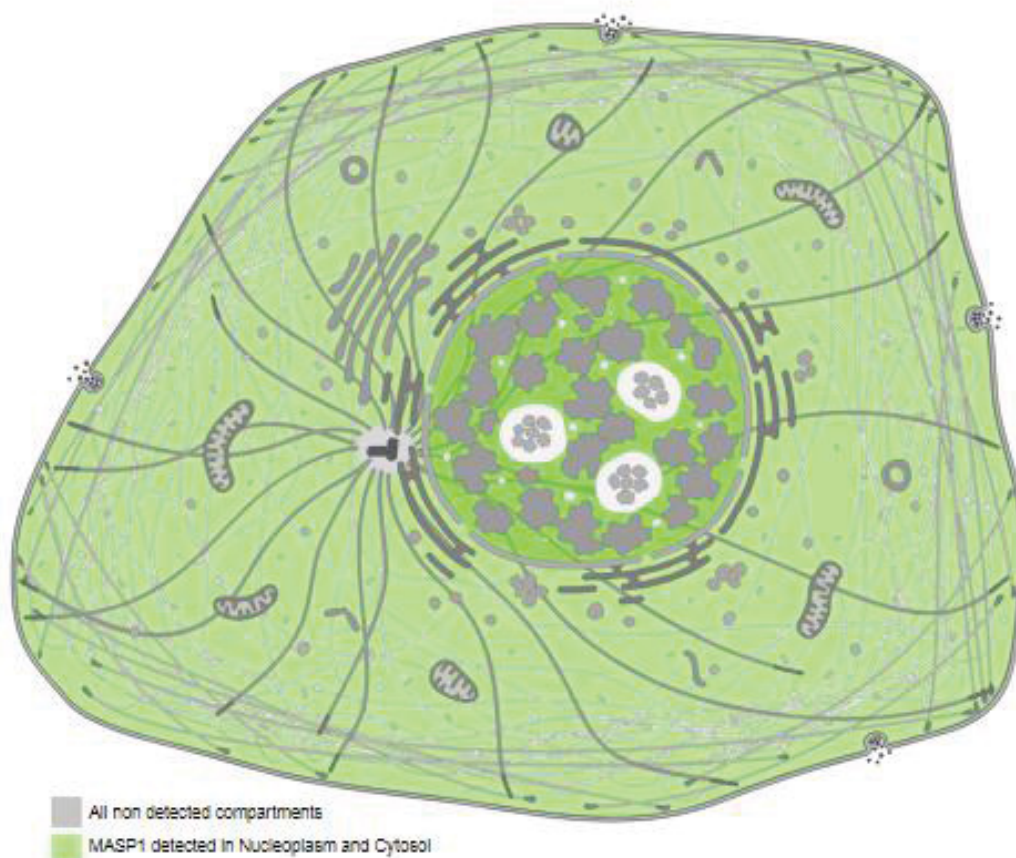


FONTE: Adaptado de Ensembl Gene Browser (2022).

2.3.5 Expressão das proteínas MASP-1 e MASP-3 em tecidos normais e tumorais

Como comentado no tópico anterior, as MASP-1 e MASP-3 são proteínas séricas, entretanto é possível encontrar as MASPs no citoplasma e no núcleo (The Human Protein Atlas, 2022) (FIGURA 8). Uma vez que a MASP-3 e a MASP-1 possuem como destino final uma via secretora, é improvável que estas proteínas retornem ao núcleo da célula e sejam elas as identificadas na Figura 8. Dentro desta linha de raciocínio, é possível que a MASP encontrada no núcleo possa ser a MASP-3 intracelular. (FIGURA 8)

FIGURA 8. PRINCIPAIS LOCAIS ONDE SE ENCONTRAM AS PROTEÍNAS MASP-1 E A MASP-3 NA CÉLULA.



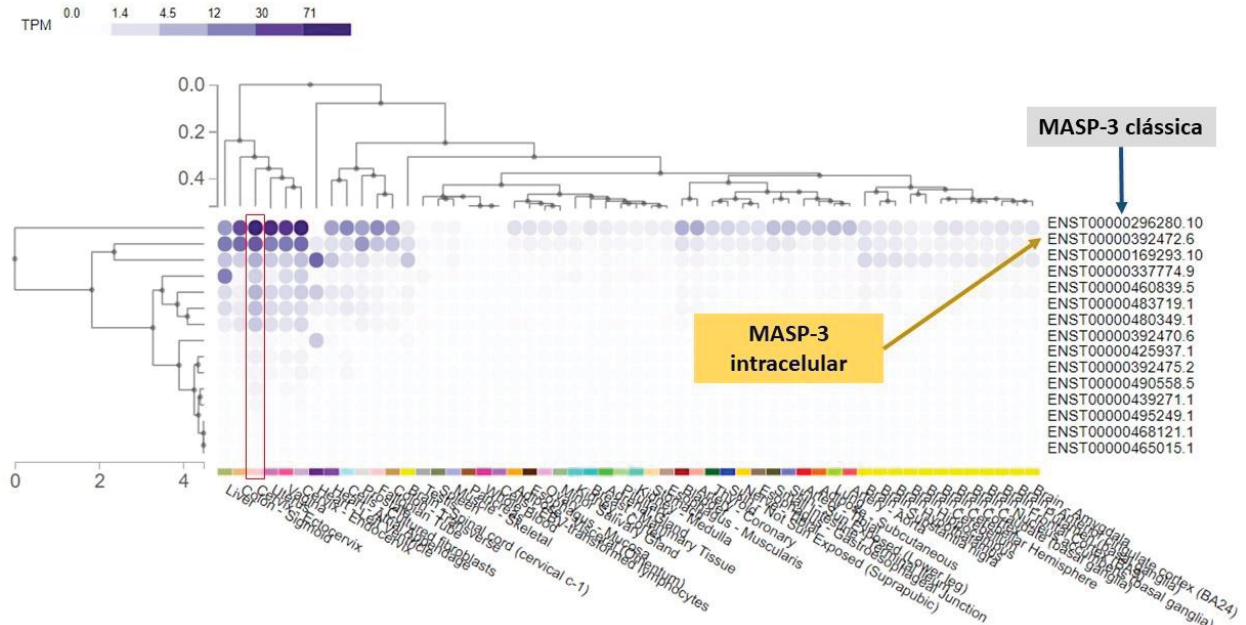
FONTE: Adaptado de The Human Protein Atlas.

Em relação a expressão de mRNA de *MASP1* nos tecidos, encontramos o fígado sendo o local de maior expressão, seguido pela cervix uterina e pelo músculo cardíaco (The Human Protein Atlas, 2022), além disso, essas proteínas podem ser encontradas no soro/plasma em concentrações específicas.

Quando analisamos a expressão de mRNA dos diferentes transcritos de *MASP1*, observamos que o mRNA da MASP-1 possui expressão detectável somente no fígado e nos tecidos reprodutivos femininos, sendo sua maior expressão nos hepatócitos (TPM=12,8) e, uma menor expressão em tecidos reprodutivos femininos (GTEx Portal, 2022). O mRNA da MASP-3 está expresso em mais tecidos que o mRNA da MASP-1, apresentando alta expressão nos tecidos reprodutivos femininos,

sendo a maior taxa na cérvix uterina (TPM=71,0). Similarmente, o mRNA da MASP-3 intranuclear encontra-se expresso em diversos tecidos com maior expressão na cérvix uterina (TPM=21,8) (GTEx Portal, 2022) (FIGURA 9).

FIGURA 9. EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS DA MASP-3 CLÁSSICA E DA MASP-3 INTRACELULAR NO TECIDO DA CÉRVIX UTERINA.



FONTE: Adaptado do GTEx dataset (2022).

LEGENDA: Os transcritos da MASP-3 clássica e da MASP-3 intracelular são altamente expressos no tecido da cérvix uterina (marcado em vermelho). Disponível em: < <https://gtexportal.org/home/gene/MASP1#gene-transcript-browser-block> >.

2.3.6 Papeis desempenhados pelas proteínas MASP-1 e MASP-3 fora da via das lectinas.

As proteínas MASP-1 e MASP-3 desempenham funções que envolvem outras vias celulares fora da VL. Embora as MASPs e C1r/C1s pertencem à mesma família proteica, a MASP-1 difere filogeneticamente e estruturalmente dessas outras proteases. Há duas linhagens filogenéticas das MASPs: (1) inclui o códon do tipo *TCN* (onde o "N" significa qualquer uma das bases nitrogenadas) para o domínio SP, essa região gênica apresenta exons divididos por íntrons, além disso a proteína transcrita,

a MASP-1, possui alça de histidina e ponte de bissulfetos, característica relacionadas as tripsinas serina proteases (BOLDT *et al.*, 2016); (2) inclui o códon do tipo AGY (onde o Y pode ser C ou T) com região gênica do domínio SP não dividida, (um único exon) e também não apresentam alça de histidina, as proteínas MASP-2, MASP-3, C1r e C1s derivam desta segunda linhagem (FUJITA, 2002; JI *et al.*, 1997; KIMURA; SAKAGUCHI; NONAKA, 2009; NONAKA; MIYAZAWA, 2001)

Dentro do complemento a MASP-1 possui papel central na ativação da VL, no entanto, seus substratos não se restringem ao SC, ela também cliva substratos da cascata de coagulação, como fator XIII (FXIII), cininogênio, receptor 4 ativado por protease (PAR4) em células endoteliais, protrombina e o fator antifibrinolítico inibidor de fibrinólise ativado por trombina (TAFI) (DOBÓ *et al.*, 2014; DOBÓ; KOCSIS; GÁL, 2018; JENNY *et al.*, 2018; KRARUP *et al.*, 2007, 2008; Megyeri *et al.* 2009; Jenny *et al.* 2019).

MASP-1 e trombina compartilham a conformação dos sítios catalíticos e alguns substratos (DOBÓ *et al.*, 2009; Jenny *et al.* 2019). Ambas as proteases possuem um sítio amplo com ligação aberta ao substrato, o que lhes permite ter uma alta capacidade de clivar diferentes substratos (DOBÓ *et al.*, 2014). No entanto, a atividade catalítica da MASP-1 em substratos de coagulação é muito menor do que a da trombina (JENNY *et al.*, 2015). O domínio SP da MASP-1 possui quatro pontes dissulfeto com ausência da alça de histidina, o que o torna conformacionalmente mais relacionado à trombina (DEGN *et al.*, 2013; DOBÓ *et al.*, 2014; DOBÓ; KOCSIS; GÁL, 2018; ERIKSSON *et al.*, 2020).

Jenny e colaboradores demonstraram que, no soro, MASP-1 poderia clivar a pro trombina em pelo menos três locais: R393, R155 e R271 (JENNY *et al.*, 2015). O local de clivagem da pro trombina R155 é outra semelhança entre MASP-1 e a trombina, enquanto o local R271 é compartilhado com o fator Xa (FXa). No entanto, o sítio R393 é exclusivo da MASP-1 (DOBÓ; KOCSIS; GÁL, 2018; JENNY *et al.*, 2015).

A clivagem da subunidade A do fator XIII e da cadeia β -fibrinogênio ocorre no mesmo sítio proteolítico para MASP-1 e trombina. No entanto, o sítio de clivagem da cadeia do α -fibrinogênio é específico para cada protease, que apresenta diferentes potenciais para a formação de fibrina (HESS *et al.*, 2012; KRARUP *et al.*, 2008).

Embora MASP-1 e trombina pareçam ter um efeito aditivo na coagulação sanguínea (JENNY *et al.*, 2015), eles diferem quanto ao modo e tempo de formação do coágulo (JENNY *et al.* 2019). Os coágulos formados na presença de MASP-1 sérico têm uma estrutura de fibrina diferente (HESS *et al.*, 2012). Outros pontos importantes são o envolvimento dos complexos MBL e MASP-1/MASP-3 com hemostasia *in vivo* (TAKAHASHI *et al.*, 2011), e a ativação de MASP-1 complexado com ficolinas ou MBL está diretamente associada com a geração de coágulos de fibrina (GULLA *et al.*, 2010). A MASP-1 atua na fase tardia da coagulação, acelerando o tempo de coagulação e a formação de coágulos no sangue total e plasma pobre em plaquetas, condições fisiológicas que podem ser encontradas em muitas patologias e doenças infecciosas, incluindo COVID-19 (JENNY *et al.*, 2015; JENNY *et al.* 2019). Assim, MASP-1 desempenha papéis importantes - e ainda pouco conhecidos - na ativação direta de vias pró-coagulantes.

A MASP-1 e a trombina também ativam as células endoteliais de maneiras distintas. MASP-1 liga-se ao PAR4 com maior preferência do que ao PAR1 e PAR2, enquanto a trombina tem preferência pelo PAR1 (MEGYERI *et al.*, 2009). Assim, a MASP-1 ativa as células endoteliais com a geração de um padrão específico de resposta imune, que promove a quimiotaxia dos neutrófilos e estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-8 (JANI *et al.*, 2014). Além disso, a clivagem do PAR4 pela MASP-1 induz sinalização de Ca^{2+} e as vias NF kappaB e p38 MAPK, vias intracelulares importantes no processo de (MEGYERI *et al.*, 2009). Desta forma, nota-se que a MASP-1 tem um papel que vai além daquelas que se assemelham funcionalmente à trombina na coagulação, sendo de grande importância não só na ativação do VL, mas também como componente chave da ligação entre o processo inflamatório e a cascata de coagulação.

A MASP-3 é uma proteína pouco caracterizada, sendo assim, ainda há muito para se entender sobre suas funções fisiológicas. Entretanto, o fator de crescimento semelhante à insulina 5 (IGFBP-5) e o fator D (FD) são substratos conhecidos dessa protease (CORTESIO; JIANG, 2006; DOBÓ *et al.*, 2016b). Acredita-se que a MASP-3 contribua positivamente para a ativação da via alternativa através da clivagem do pró-fator D em FD (DOBÓ *et al.*, 2016a). MASP-3 cliva IGFBP-5, que se liga aos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) e modula as ações do IGF na proliferação, diferenciação, sobrevivência e motilidade celular (CORTESIO; JIANG,

2006). A IGFBP-5 também regula esses eventos celulares por meio de mecanismos independentes de IGF (MATSUSHITA; ENDO; FUJITA, 2013). Os três sítios em IGFBP-5 clivados por MASP-3 contêm todos um resíduo Lys/Arg na posição P1 e um resíduo Pro na posição P2, desta maneira a especificidade do substrato de MASP-3 é Pro-Arg/Lys-X (CORTESIO; JIANG, 2006). Se considerarmos as ações citadas da IGFBP-5 e sua relação com a MASP-3, é possível que a proteína MASP-3 possa desempenhar papéis importantes nas células tumorais via IGFBP-5.

Além disso, uma deficiência de MASP-3 devido a mutações no gene *MASP-1* está associada à síndrome 3MC um grupo de distúrbios do desenvolvimento (ROORYCK *et al.*, 2011; SIRMACI *et al.*, 2010), sugerindo que MASP-3 tem um papel crucial nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário humano e na migração de neurônios durante o desenvolvimento cerebral (GORELIK *et al.*, 2017; MATSUSHITA; ENDO; FUJITA, 2013).

2.3.7 Polimorfismos no gene *MASP1* e associação com doenças

O gene *MASP1* possui uma região reguladora com sítios CpG não metilados, estendendo-se desde o promotor até o íntron 2, que abriga um forte intensificador com sítios reconhecidos por fatores CEBP (proteínas de ligação de intensificador de CAAT). Essa região também apresenta altos níveis de lisina 27 acetilada da histona 3 (H3K27), uma modificação de histona típica de genes expressos (BOLDT *et al.*, 2016). Existem vários sítios de ligação de CTCF (*CCCTC-binding factor*) distribuídos a partir dos exons 6 até o 8 que possuem capacidade de regulação gênica (BOLDT *et al.*, 2016).

Desta maneira, polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) tem capacidade de alterar a taxa de expressão das MASPs bem como a composição proteica dos domínios de MASP-1 e MASP-3. Todavia, poucos polimorfismos em *MASP1* foram investigados até a presente data, e esse número é ainda menor em relação a associação deles com doenças. SNPs em *MASP1* já foram associados com hanseníase (MENDES *et al.*, 2020), pênfigo foliáceo (BUMILLER-BINI *et al.*, 2018), com a doença de Chagas (CAVALCANTI *et al.*, 2022), Lúpus (dados ainda não

publicados) e com a síndrome Malpuech, Michels, Mingarelli e Carnevale (3MC) (GAJEK; ŚWIERZKO; CEDZYŃSKI, 2020).

Ammiztblol (2016) investigou 15 SNPs em *MASP1*, e observou que 7 deles causam alterações nas concentrações das proteínas MASP-1, MASP-3 e MAp-44 em indivíduos saudáveis (doadores de sangue). Três SNPs analisados levam ao aumento de MASP-1 mas diminuição da MASP-3, são eles o *rs3774275* localizado no íntron 8, local de regulação gênica e também de splicing (*rs3774275*AG*: aumento de 10% da MASP-1 e diminuição de 8% da MASP-3, *rs3774275*GG*: aumento de 13% de MASP-1 e diminuição de 26% de MASP-3), o *rs67143992* no exon 12 (*rs67143992*GA*: aumento de 12% de MASP-1 e diminuição de 16% de MASP-3, e o genótipo *rs67143992*AA*: aumento de 15% de MASP-1 e diminuição de 31% MASP-2), e o *rs698090* na região 3'UTR do exon 9 (*rs698090*CC*: aumento de 11% de MASP-1 e diminuição de 23% MASP-3).

Ao contrário, o *rs72549154* no exon 12 leva ao a diminuição de MASP-1 e aumento de MASP-3 (*rs72549154*GT*: diminuição de 14% de MASP-1 e aumento de 13% na MASP-3). Alguns polimorfismos possuem influência em somente uma das MASPs, os *rs19050338* e *rs35089177*, ambos na região promotora, influenciam na concentração de MASP-1, enquanto que os *rs7284004* e *rs72549254* influenciam as concentrações séricas somente da MASP-3 (AMMITZBØLL et al., 2013).

Os distúrbios da síndrome 3MC são causados por mutações nos genes *MASP1*, *COLEC11* ou *COLEC10*, A síndrome 3MC é uma doença rara, autossômica recessiva, caracterizada por um amplo espectro de anormalidades de desenvolvimento que podem incluir sobrelhas arqueadas, fissura labiopalatina, perda auditiva, baixa estatura, hérnia umbilical/onfalocele e anormalidades urogenitais (GAJEK; ŚWIERZKO; CEDZYŃSKI, 2020).

Essas mutações abortam ou prejudicam a função de suas proteínas correspondentes, resultando em controle defeituoso da migração celular em um estágio inicial do desenvolvimento embrionário, interferindo na ontogênese de tecidos e órgãos. No total são 20 polimorfismos em *MASP1* associados a 3MC, a MASP-3 é a proteína que está mais alterada nessa síndrome, sendo 13 mutações no exon 12 (exon exclusivo da MASP-3), 2 no exon 6, uma em cada um dos exons 2 e 4, e

somente três polimorfismos nos íntrons 6 e 7 (ATIK *et al.*, 2015; ROORYCK *et al.*, 2011; SIRMACI *et al.*, 2010; URQUHART *et al.*, 2016). Esses dados nos indicam que a MASP-3 desempenham papel fundamental no desenvolvimento embrionário humano.

Recentemente, nosso grupo mostrou que os polimorfismos *rs13064994*, *rs1109452* e *rs850314* em *MASP1* estão associados tanto a suscetibilidade a hanseníase como com a alteração nas concentrações séricas de MASP-1, MASP-3 e MAp44 (MENDES, 2020), os quais também serão investigados neste trabalho na suscetibilidade ao câncer cervical. Dois SNPs que estão localizados na região 3'UTR do exon 12, *rs1109452* e *rs850314*, parecem influenciar a taxa de expressão do transcrito de MASP-3, onde os alelos *11098452*T* e *rs850314*A* aumentam a concentração sérica de MASP-1 e MASP-3, em contrapartida os haplótipos *r11098452_rs850314*CA* ou *r11098452_rs850314*CG* levam a diminuição de MASP-3 sérica, provavelmente devido à afinidade de microRNAs a este local, o miR-3181 tem alta afinidade por CG e o miR-2861 pelo CA (MENDES *et al.*, 2020).

Estes dois SNPs estão localizados no gene adjacentes um do outro e estão em completo desequilíbrio de ligação, a combinação ancestral CG mantém o sítio 5'CpG3' fosforilado já a combinação TA leva a quebra do radical fosfato deste sitio de controle gênico (MENDES *et al.*, 2020). Além disso, há um controle epigenético da região 3'UTR do exon 12 que influencia a produção de MASP-3 em tecidos específicos, no cérebro a citosina do sítio CpG encontra-se metilada e a expressão de mRNA de *MASP1* é baixa, contudo em linhagens celulares de tecidos reprodutivos femininos e do fígado este sítio não está metilado, mas possui alta produção de MASP-3 (MENDES *et al.*, 2020). Os SNPs *rs13064994* e *rs7609662* estão localizados no íntron 1, uma região reguladora importante do gene. Porém somente o *rs13064994* foi associado com o aumento da MASP-3 (*rs1306994*T* e *rs1306994*CC*), e o *rs7609662* não foi associado neste estudo com hanseníase (MENDES *et al.*, 2020).

Outro estudo recente, mas com modelo de doença autoimune, o pênfigo foliáceo, também observou associação com polimorfismos de *MASP1* (BUMILLER-BINI *et al.*, 2018). Os autores observaram um papel protetivo para os *rs13094773*, *rs850309* e *rs72549154*, por outro lado, dois SNPs foram associados a suscetibilidade, *rs3864098* e *rs698104*, ambos localizados em regiões intrônicas

regulatórias (BUMILLER-BINI *et al.*, 2018). Além disso, o genótipo rs3864098*C foi associado a diminuição dos níveis de MASP-3, e o rs72549154*TT ao aumento dos níveis de MASP-3 e diminuição da MASP-1. Os haplótipos rs1309477_rs3864098_AC, rs1309477_rs698104_AT e rs3864098_rs698104_CT foram associados tanto a suscetibilidade ao pênfigo como com aumento da MASP-1 (BUMILLER-BINI *et al.*, 2018).

2.3.8 Isoformas do gene *MASP1* no câncer

As três vias clássicas e as vias não clássicas do complemento podem ser ativadas de maneira independente (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011), e desta forma, os efeitos do complemento no microambiente tumoral podem variar desde uma inflamação local e crônica que pode desempenhar um papel pró ou antitumoral, à inibição de respostas linfocíticas antitumorais, levando ao aumento do crescimento e invasão de células tumorais (BULLA *et al.*, 2016; REVEL *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2019).

A evolução e o estabelecimento de um tumor são marcados pela aquisição de alterações genéticas e epigenéticas, gerando uma assinatura antigênica diferencial entre as células malignas e as células normais. De acordo com a hipótese da vigilância imunológica, células tumorais são eficientemente eliminadas pelas respostas imunológicas inata e adaptativa, através da identificação de moléculas associadas aos tumores (PIO; AJONA; LAMBRIS, 2013; REIS *et al.*, 2017). Entretanto, as células tumorais são capazes de escapar da fase inicial do ataque imunológico (processo de eliminação) e se mantém em equilíbrio durante períodos onde elas estão em divisão, sofrendo alterações das assinaturas genéticas e epigenéticas (PIO; AJONA; LAMBRIS, 2013). O perfil de proteases apresentados pelos tumores tem grande relevância, devido a sua habilidade de clivar a matriz celular, facilitando o processo de invasão tumoral e metástase. Contudo, o seu papel não está completamente elucidado, devido ao elevado número de genes das proteases que apresentam diversos tipos de mutações, em diferentes tipos de cânceres (FRAILE *et al.*, 2013).

A alta expressão do gene *MASP1* em câncer foi relatada por três estudos (KANG *et al.*, 2009; KONG *et al.*, 2020; KURAYA *et al.*, 2003). No carcinoma de

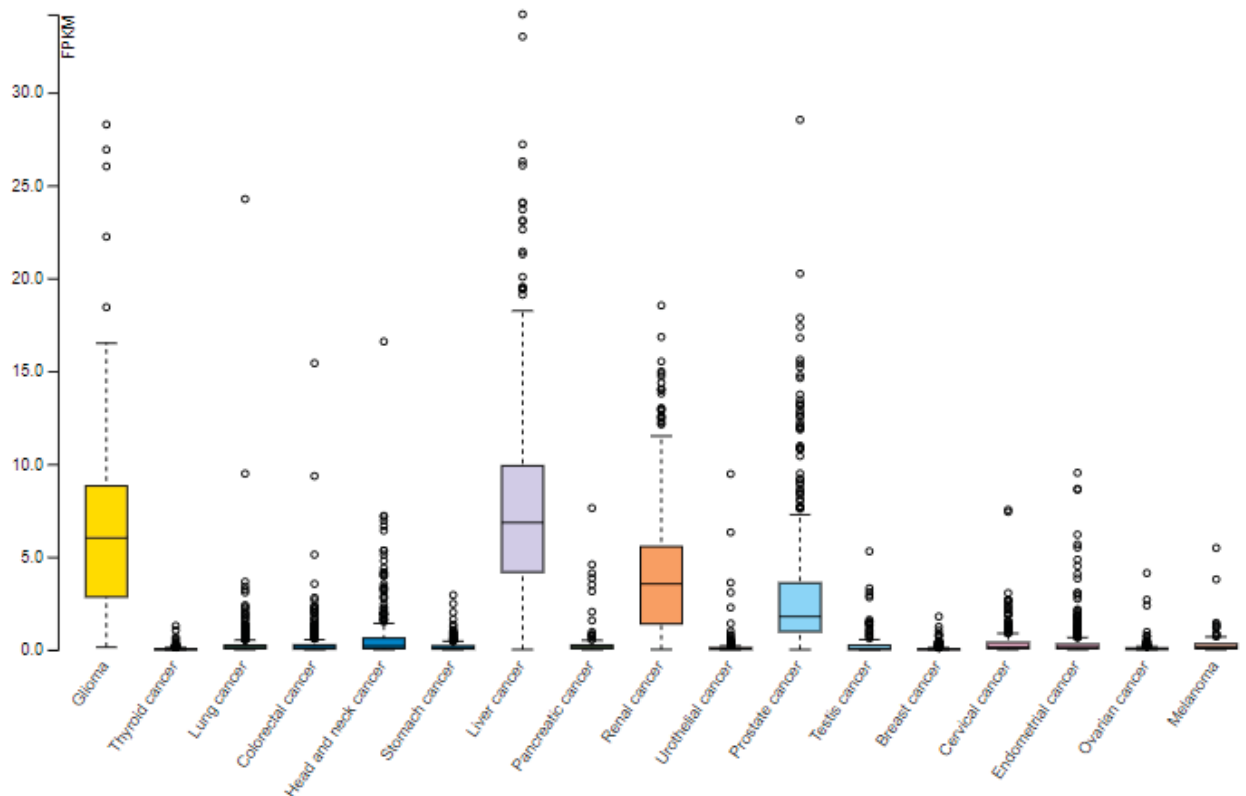
células escamosas do pulmão foi observado um aumento de 18% de mRNA de *MASP1*, e os autores sugerem que *MASP1* possa ser um novo candidato a gene-alvo pode estar associado a propriedades fenotípicas que diferenciam os estágios iniciais desse câncer (KONG *et al.*, 2009). Em câncer cervical Kong (2020) e colaboradores relatam aumento da expressão de *MASP1* no tecido tumoral de maneira dependente do estágio, porém não houve associação significativa entre altas taxas de *MASP1* e a taxa de sobrevida das pacientes (KONG *et al.*, 2020). Maestri (2018) observou a ativação da VL em CC, com altos níveis de MASP-1 sérica, mas sem diferença significativa nos níveis de MASP-3 e MAP44 (MAESTRI *et al.*, 2018).

Kuraya (2003) observaram altos níveis de mRNA de MASP-1 e MASP-3 em linhagens celulares T98G de glioma, além disso, houve aumento significativo na secreção de MASP-1 e MASP-3 pela cultura de células. Esse estudo também observou aumento da expressão da ficolina-2, sugerindo uma ativação exacerbada da via das lectinas (KURAYA *et al.*, 2003). Dados do banco de dados *Human Protein Atlas* corroboram com esses achados, podemos observar uma alta expressão tanto de mRNA de MASP-1 como da proteína MASP-1 em glioma, é importante destacar que o glioma é o único tecido tumoral com expressão de MASP-1, todos os outros tipos de cânceres não expressam a proteína (The Human Protein Atlas, 2022).

Ao contrário dos estudos discutidos acima, observamos dados de baixa expressão de *MASP1* no câncer em diferentes bancos de dados e em um estudo com câncer de colo retal (2013) (FRAILE *et al.*, 2013). No câncer de cólon retal a MASP-3 é uma proteína com importante ação antitumoral, os autores observaram a que a expressão da mRNA de MASP-3 estava diminuída em 2000 vezes nos tumores, além disso, a expressão de ectópica de MASP-3 bloqueia a formação de novos tumores, e *in vitro* a expressão dessas proteínas é capaz de diminuir a proliferação tumoral (FRAILE *et al.*, 2013). Outras proteínas do complemento não foram significativas neste estudo, sugerindo que a MASP-3 neste tipo de câncer não desempenham somente o papel no complemento. Da mesma forma, a alta expressão de mRNA de MASP1 é um prognóstico para o câncer de fígado, à elevada expressão aumenta em 56% a taxa de sobrevida em 5 anos das pacientes, e a baixa expressão diminui em 30% (The Human Protein Atlas, 2022).

De maneira geral, os tecidos tumorais não expressam a proteína MASP-3 e nem a MASP-1 (com exceção do glioma) (The Human Protein Atlas, 2022), e destacamos a diminuição significativa que ocorre no CC, onde no tecido normal há elevadas taxas de mRNA MASP1 (120.0 nTPM) e no tecido tumoral essa taxa diminui muito (0,2 FPKM) (The Human Protein Atlas, 2022) (FIGURA 10).

FIGURA 10. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MASP-1 E MASP-3 EM TECIDOS TUMORAIS.



FONTE: Adaptado de The Human Protein Atlas (2022).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Esse estudo foi realizado com mulheres com diagnóstico confirmado de NIC II, NIC III e câncer do cervical residentes de Curitiba-PR e regiões metropolitanas, assistidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Hospital Erasto Gaertner durante o período de 2017 a 2019, por meio de uma colaboração estabelecida com a Doutora Fernanda Villar Fonseca e o Doutor José Clemente Linhares, chefes dos serviços no hospital. Não incluímos pacientes com NIC I, nem mulheres da população indígena, dadas as suas particularidades contempladas na Resolução Complementar do Conselho Nacional de Saúde/CNS.

Utilizamos dois grupos para realizar as análises de comparação com as pacientes neste trabalho, e buscamos agrupá-las seguindo algumas características preconizadas como sendo as ideais para um estudo caso-controle com NIC e CC, contudo, consideramos que houveram limitações neste processo que não nos permitiram seguir todos os critérios estabelecidos. O primeiro grupo que consideramos como grupo controle, é formado por mulheres saudáveis sem alterações ginecológicas, negativas para os genótipos de HPV oncogênicos, as quais foram atendidas no Hospital Universitário de Londrina - PR, e cedidos a nossa pesquisa por meio de uma colaboração com o serviço do Laboratório de Genética Molecular e Imunologia – UEL. O segundo grupo, considerado como grupos de comparação, foi formado por mulheres doadoras voluntárias de sangue do banco de sangue do nosso laboratório, Laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

As pacientes foram submetidas a um questionário autodeclarado que buscou avaliar características étnicas, sociais e fatores de risco já associados às doenças. Além disso, para o grupo com CC, informações clínicas, como estadiamento, ocorrências de NICs prévios e cirurgias foram buscados nos prontuários eletrônicos do Hospital Erasto Gaertner no período de agosto de 2021. Não foram feitas restrições quanto à orientação sexual, escolaridade, classes e grupos sociais das participantes do estudo, entretanto mulheres de descendência asiática e indígenas não foram incluídas nas análises genéticas devido a sua diversidade genética. A caracterização clínicas das pacientes incluídas nos grupos estão na tabela 1.

TABELA 1. DESCRIÇÃO CLÍNICA DOS GRUPOS DE PACIENTES DE CÂNCER CERVICAL E LESÃO INTRAEPITELIAL DE ALTO GRAU, E OS GRUPOS CONTROLE E COMPARAÇÃO.

	Grupo controle n=121	Grupo comparação n=129	Câncer cervical n=99	NIC de alto grau n=219	Valor de p
Média de idade ± DP (anos)	48 ± 12.79	35.89 ± 8.12	52.26 ± 13.52	33.74 ± 6.91	0.0012 C vc CC 0.002 Cp vs CC 0.0038 CC vs CIN
[Min-Max]	18-70	22-58	28-88	22-46	
Grupos étnicos n (%)					
Euro-Brasileiros	105 (86.77)	114 (88.37)	85 (85.86)	189 (86.30)	0.068 C vc CC 0.097 Cp vs CC 0.083 CC vs CIN
Afrodescendentes	16 (13.22)	15 (11.63)	14 (14.14)	30 (13.69)	
Histórico familiar de câncer n (%)	19 (15.70)	n.a.	72 (72.83)	82 (37.44)	
Histórico de lesão intraepitelial cervical n (%)					
NIC I	0	n.a.	6 (0.06)	22 (10.04)	
NIC II ou NIC III	0	n.a.	34 (0.34)	n.ap.	

NIC: neoplasia intraepitelial; DP: desvio padrão; %: porcentagem correspondente; n.ap: não aplicável; Min: mínimo; Max: máximo.

Fonte: O autor, (2023).

3.1.1 Pacientes com NIC de alto grau

As amostras de pacientes do grupo NIC de alto grau (n = 219) foram provenientes do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da Universidade Federal do Paraná (LIGH-UFPR). As pacientes eram atendidas pelo Hospital Erasto Gaertner (Curitiba, PR) e foram convidadas nesse local para participarem do estudo. O projeto de pesquisa para a coleta dessas amostras foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Erasto Gaertner (CEP: 81520-0600, protocolo 1943. Todas as mulheres assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Foram incluídas apenas pacientes com diagnóstico confirmado para NIC III ou NIC III, maiores de 18 anos e que aceitaram participar da pesquisa. Não foram incluídas mulheres que tiveram relação sexual em até 24 horas antes da coleta, que

apresentaram algum exame de citologia cervical alterado previamente, ou que já haviam sido submetidas ao procedimento de cauterização no colo do útero.

3.1.2 Pacientes com Câncer Cervical

O grupo CC é composto por mulheres com/ou que tiveram câncer do colo do útero. A maioria das pacientes já havia passado pelo tratamento do câncer e, no momento da coleta, estava aguardando consulta médica para seguimento da doença no Hospital Erasto Gaertner. O projeto deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Erasto Gaertner (CAAE: 62542616.7.3001.0096), número do protocolo: 125417/2016. Todas as mulheres assinaram o TCLE.

Foram incluídas 99 mulheres que têm ou tiveram carcinoma *in situ*, carcinoma microinvasor, carcinoma invasor, adenocarcinoma ou carcinoma de células escamosas, com idade igual ou superior a 18 anos no momento da coleta. Foi realizada uma entrevista, seguindo um modelo de questionário, e coleta de sangue para posterior extração de DNA.

Desse grupo foram coletados dois tipos de materiais biológicos usados para análise neste trabalho. Sangue periférico para extração de DNA e genotipagem dos SNPs de *MASP1*, e amostras parafinadas dos tumores retirados durante cirurgias ou procedimentos para análise da imunohistoquímica. Tanto o sangue como as amostras parafinadas são das mesmas pacientes (quando disponível a coleta deste último).

TABELA 2. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM CÂNCER CERVICAL E LESÃO INTRAEPITELIAL DE ALTO GRAU.

	Câncer Cervical n=99	NIC de alto grau n=219
Histórico de doenças sexualmente transmissíveis n (%)	5 (0.05)	43 (19.63)
Idade na primeira relação sexual média $\pm$ DP (em anos)	17.49 $\pm$ 3.62	16.16 $\pm$ 2.72
Número de gravidez média $\pm$ DP (em anos)	3.44 $\pm$ 2.6	6.96 $\pm$ 1.96
Número de abortos espontaneos		

	Média ± DP (em anos)	1.68 ± 1.25	1.48 ± 0.76
Idade no diagnóstico			
	Média ± DP (em anos)	45.32 ± 13.16	18.39 ± 5.88
Morte durante o estudo	n (%)	13 (0.13)	n.a.
Histórico de tabagismo			
	Fumante ativo n (%)	20 (0.20)	167 (76.25)
	Ex-fumante n (%)	2 (0.02)	33 (15.07)
Tipo histológico de CC			
	Adenocarcinoma n (%)	14 (0.14)	n.ap.
	Carcinoma de células escamosas n (%)	85 (0.86)	n.ap.
Classificação FIGO*			
I			
	I A1 n (%)	5 (0.05)	n.ap.
	I A2 n (%)	3 (0.03)	n.ap.
	I B1 n (%)	6 (0.06)	n.ap.
	I B2 n (%)	5 (0.05)	n.ap.
II			
	II A n (%)	3 (0.03)	n.ap.
	II B n (%)	25 (0.25)	n.ap.
III			
	III A n (%)	3 (0.03)	n.ap.
	III B n (%)	14 (0.14)	n.ap.
	III C n (%)	0	n.ap.
IV			
	IV A n (%)	1 (0.01)	n.ap.
	IV B n (%)	2 (0.02)	n.ap.
Tratamento*			
	Conização n (%)	55 (0.55)	0
	Cauterização cervical n(%)	3 (0.03)	100 (45.66)
	Histerectomia n(%)	14 (0.14)	0

n.ap.: não aplicável; Classificação FIGO*: 32 pacientes com CC não têm a classificação FIGO disponível no registo médico eletrónico; Tratamento*: 27 pacientes não têm informações de tratamento disponíveis no registo médico eletrónico; n.a.: não disponível.

Fonte: O autor, (2023).

3.1.3 Grupo comparação

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

Neste grupo foram incluídas 129 mulheres saudáveis doadoras voluntárias de sangue em um banco de sangue de Curitiba (PR) (BOLDT *et al.*, 2011), as quais foram pareadas aos grupos de pacientes em idade e etnia. Consideramos este grupo como comparação devido ao fato de que não tínhamos acesso a dados ginecológicos dessas mulheres, contudo entendemos que como elas são doadoras de sangue encontram-se saudáveis no momento da coleta de sangue. As mulheres desse grupo tinham idade igual ou superior a 18 anos no momento da coleta. Não foram feitas restrições quanto à orientação sexual, escolaridade, classes e grupos sociais.

3.1.4 Grupo controle

Este grupo é composto por 121 mulheres negativas para os genótipos de HPV oncogênicos atendidas no Hospital Universitário de Londrina – Universidade Estadual de Londrina (UEL) e foram pareadas com os grupos de pacientes pela idade e etnia. As amostras de DNA foram cedidas pela Professora Doutora Karen Brajão da UEL e genotipadas para os 9 SNPs de *MASP1*.

3.2 COLETA DE SANGUE

Foi realizada coleta de sangue de pacientes no Hospital Erasto Gaertner, no período de 2017, pelas pesquisadoras Tatiane da Piedade Batista Godoy e Stefanie Epp Bosh. Foram coletados de 12 a 15 mL de sangue periférico: 4-5 mL em tubos contendo EDTA e 8-10 mL em tubos sem anticoagulante. As amostras foram levadas ao Laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital de Clínicas - UFPR para separação do *buffy-coat*, do soro e do plasma. O *buffy-coat* foi utilizado para extração de DNA, enquanto que o soro e plasma foram armazenados a -80°C para a análise de proteínas.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

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

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

3.4 SNPS DO GENE *MASP1*

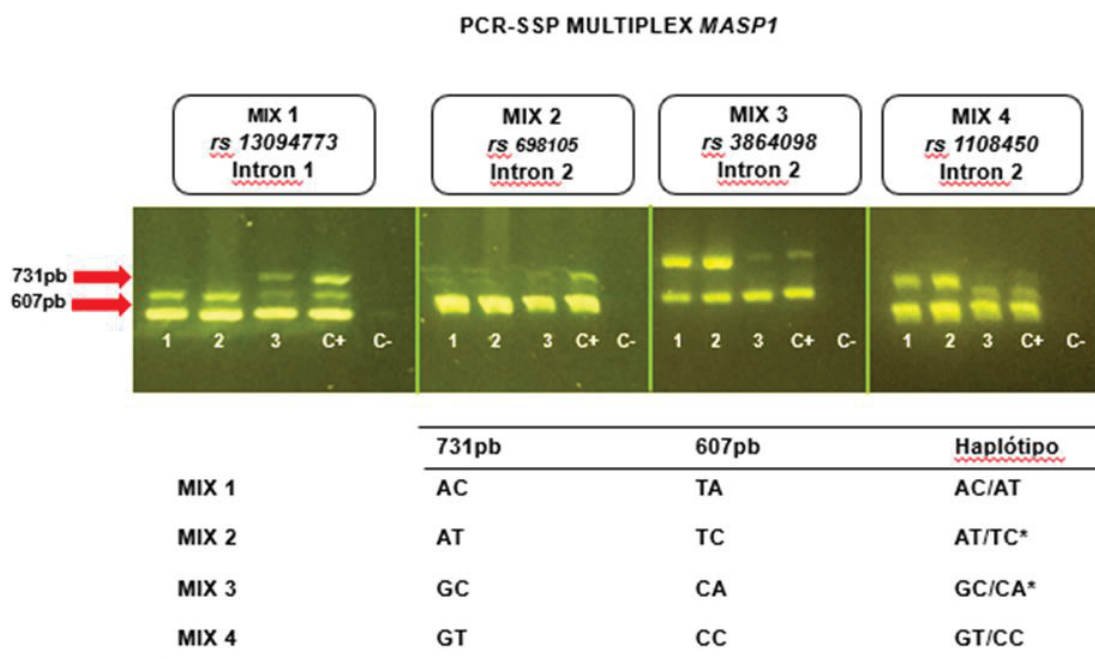
Quatro SNPs do gene *MASP1* (ENSG127241) foram avaliados pelo método de reação em cadeia da polimerase sequência específica multiplex (PCR-SSP Multiplex): *rs13094773* (A> G) localizado no íntron 1, e *rs698105* (T> C), *rs3864098* (T> C) e *rs1108450* (A> C) localizados no íntron 2. A técnica de PCR-SSP Multiplex nos permite identificar não somente a presença de um alelo, mas também permite montar combinação haplotípica de cada paciente, contribuindo para uma haplotipagem mais segura e eficaz.

Neste PCR-SSP multiplex foram gerados dois fragmentos de amplificação específicos, um com 731bp: para os *rs13094447* + *rs698105*, e outro com 607bp: para os *rs3864098* + *rs1108450*. Um fragmento de controle de amplificação de 500bp do gene *FCN2* foi gerado simultaneamente na reação. As sequências dos primers estão presentes na Tabela 3. A PCR foi realizada com 100 ng/μL de DNA, 25mM de cada dNTP, 10 mM de cada primer, 50 mM de MgCl₂, 10 μL de tampão de PCR Coral Load 10x com 2 corantes de rastreamento de gel e 5 U Taq DNA polimerase (Invitrogen), em um volume final de 15 μL. O protocolo de amplificação inicia com uma etapa de desnaturação de 5 minutos a 95°C, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos na temperatura específica de hibridização e 30 segundos a 72°C, e

concluindo com 5 minutos a 72°C na etapa final de extensão do DNA. O resultado das amplificações foi observado em transiluminador sob luz azul após corrida eletroforética em gel de agarose 1,0%, contendo 2,5µl de corante fluorescente Sybersafe para 100 mL de agarose. Os padrões de amplificação da PCR estão mostrados na FIGURA 10.

A genotipagem dos outros cinco SNPS de *MASP1* (*rs7609662* e *rs13064994* localizados no íntron 1, e os *rs72549262*, *rs1109452* e localizados no exon 12) foram previamente padronizadas em nosso laboratório por Mendes (2020), e o protocolo de amplificação não foi alterado (MENDES et al., 2020)

FIGURA 10 - PADRÃO ELETROFORÉTICO DA PCR-SSP MULTIPLEX REALIZADA PARA O GENE *MASP1*



Fonte: O Autor (2022).

LEGENDA: A, B e C: amostras do grupo comparação (doadores de sangue); Ctr: controle endógeno, primer da FCN2ex8: 500pb; *: haplótipos que não ocorrem. Interpretação dos haplótipos: Interpretação dos hapótipos: 1 = GC/GT (731pb) / TA/TA (607pb); 2 = GC/GT (731pb) / TA/TA (607pb); 3 = AC/AC (731pb) / TA/CC (607pb);

C+ = AC/AT (731pb) / TA/CC (607pb). O protocolo completo desta PRC-SPP multiplex está no APÊNDICE A.

TABELA 1. SEQUÊNCIA DE PRIMERS E TAMANHO DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS NAS DUAS REAÇÕES MULTIPLEX DE PCR-SSP DO GENE MASP1.

Primers Forward		Primers Reverse	
Reação 1			
Intron 1		Intron 1	
MASP1 rs7609662_Af	5' ATATTTGTTTCATATGTTTGAAACCA 3'	MASP1 rs13064994_Cr	5' TTCTTAAACCAATCTGTGGAAG 3' 730 pb
MASP1 rs7609662_Gf	5' ATATTTGTTTCATATGTTTGAAACCG 3'	MASP1 rs13064994_Tr	5' TTCCTTAAACCAATCTGTGGAAA 3' 730 pb
Exon 12			
MASP1 rs72549262_Cf	5' CCCTCTCTCTTAGTGTGATC 3'	MASP1 rs1109452_Tr	5' CGACTAAGTCCCCCATATTCA 3' 365 pb
MASP1 rs72549262_Gf	5' CCCTCTCTCTTAGTGTGATG 3'	MASP1 rs1109452_Cr	5' CGACTAAGTCCCCCATATTCTG 3' 365 pb
		MASP1 rs1109452_Cr2	5' CGACTAAGTCCCCCATATTTG 3' 365 pb
Reação 2			
Intron1		Intron 2	
MASP1_rs13094773_Gf	5' AAGAGAATCAAGAGTTAAATGAG 3'	MASP1_rs698105_Tr	5' CCTTGACCTGAATTCATACCA 3' 731 pb
MASP1_rs13094773_Af	5' AAGAGAATCAAGAGTTAAATGAA 3'	MASP1_rs698105_Cr	5' CCTTGACCTGAATTCATACCG 3' 731 pb
Intron 2			
MASP1_rs3864098Cf	5' TTTAATGTCATATGTCCAACACAC 3'	MASP1_rs1108450Ar	5' ATAGGGACCCCTCAAGGACCTT 3' 607 pb
MASP1_rs3864098Tf	5' TTTAATGTCATATGTCCAACACAT 3'	MASP1_rs1108450Cr	5' ATAGGGACCCCTCAAGGACCTG 3' 607 pb
Primer controle - Reação 2			
FCN2_EX8_F	5' GCCAGGCCTCAGGTATAAAG 3'	FCN2_EX8_R	5' AAAGGGTTGATTGCGGAAAC 3' 500 pb
pb: par de base; MASP1 rs1109452_Cr2 corresponde a outra variante (A) do SNP rs850314.			

3.4.1 TESTE DE HOMOGENEIDADE DAS AMOSTRAS

O teste exato de Markov de diferenciação populacional foi aplicado para verificar se haveriam diferenças na distribuição das frequências alélicas e genotípicas de *MASP1* entre as pacientes NIC II e III, e entre o grupo comparação e o controle, realizado pelo software Arlequin v.3.5.. A diferença entre todos os grupos foi significativa (NIC II vs NIC III - $p < 0,00001$; Grupo comparação vs controle - $p < 0,0001$), não sendo possível o agrupamento das populações para análise estatística.

3.5 IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA MASP-3

Este estudo incluiu 17 biópsias de histerectomia em parafina de pacientes com câncer de colo do útero, fornecidas pelo Ambulatório de Ginecologia do Hospital Erasto Gaertner (Curitiba, Brasil). Todos os pacientes foram atendidos pelo sistema público de saúde, a amostragem foi por conveniência e a busca no banco de dados de biópsias foi realizada em pacientes que deram entrada neste hospital no período de 2017 a 2019 e aceitaram participar deste estudo.

Uma análise histológica prévia dos blocos de parafina de cada amostra foi realizada por um médico patologista e, em seguida, foram marcadas duas regiões: tumor e tecido normal adjacente, ambos do mesmo paciente, que foram utilizados na *Tissue Microarrays* (TMA). As regiões normais adjacentes às regiões tumorais foram consideradas como controles.

A imunohistoquímica pela técnica TMA foi realizada em espécimes de colo uterino fornecidos por biópsia de histerectomia embebida em parafina usando anticorpo primário anti-MASP-3 (#HM2216, HyCult Biotech). A validação do anticorpo e a diluição ideal foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, usando o controle positivo recomendado, nestes casos, amostra humana normal do colo do útero. A TMA foi realizada com 17 amostras. Todos os ensaios imuno-histoquímicos incluíram um controle negativo e um controle positivo.

As lâminas imunocoradas foram escaneadas. Para cada amostra foram obtidas aproximadamente 300 imagens com objetiva de 40x e, destas, aproximadamente 250 foram excluídas, gerando aproximadamente 50 imagens satisfatórias para análise, as

quais não possuem partes em branco da borda dos cortes, ou dobras do tecido, ou fotos com baixa qualidade. O controle positivo foi usado para a montagem da "máscara" (padrão de positividade), que continha níveis adequados de imunoexpressão tecidual. A máscara foi então sobreposta às imagens da amostra e o software Image-Pro Plus identificou as áreas positivas e transformou os resultados em áreas de imunoexpressão positivas por micrômetro quadrado. A área em μm^2 obtida por este método foi dividida pela área total do campo observado, gerando assim um valor percentual para cada imagem. Posteriormente, 30 campos de alta potência por caso (30 campos de cada região marcada por paciente) foram selecionados e o biomarcador foi medido. A análise da imagem foi realizada e a porcentagem de presença tecidual de MASP-3 por HPF foi obtida em cada amostra.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os dados de genotipagem dos SNPs de *MASP1* as frequências de alelos, genótipos e haplótipos foram estimadas e comparadas por tabelas de distribuição de qui-quadrado com correção de Fisher usando os softwares STATA 9.0 e SNPStats (<https://www.snpstats.net/start.htm>). O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado com o Arlequin v.3.5.. A análise do desequilíbrio de ligação (DL) entre os SNPs de *MASP1* foi calculada pelo software SNPStats.

A combinação de fase gamética e haplotípica foi realizada manualmente pelo Excel após a leitura dos géis, pois a multiplex nos permite essa montagem, contudo, em seguida ela foi confirmada através da reconstrução baseada em algoritmo pseudo Baesyano com o pacote de programas Arlequin v.3.5. Além disso, foi realizado o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada haplótipo gerado. A ordem dos alelos em cada um dos haplótipos segue a ordem de aparecimento dos polimorfismos no gene. Foram montados haplótipos distintos com os alelos do íntron 1, do íntron 2 e exon 12, e também foram montados os haplótipos gerais contendo todos dos alelos investigados no gene.

A escolha do melhor modelo de herança foi realizada utilizando as informações de Akaike (AIC) para minimizar a entropia esperada. A análise do desequilíbrio de ligação (Δ') entre os SNPs *MASP1* foi calculada pelo software SNPStats. O algoritmo EM ou o método Markov Chain Monte Carlo foi utilizado para a estimação dos haplótipos. Todos os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

3.6.1 Teste de regressão logística binária

O teste de regressão logística binária foi realizado para verificar se haveria associação entre as frequências genotípicas e haplotípicas de *MASP1* e o diagnóstico das pacientes (NIC de alto grau e câncer cervical), corrigindo os valores para as variáveis independentes idade e etnia, que foram associadas com o diagnóstico das pacientes na análise univariada (valor de $P \leq 0.20$). Testamos os efeitos dominante, recessivo e aditivo de cada SNP nessa análise. A associação de significância estatística foi valores de $p < 0,05$. Foram analisadas como variáveis nos grupos de NIC de alto grau, controle e pacientes: uso de contraceptivo oral, tabagismo, idade da primeira relação sexual, idade no primeiro parto, número de partos, número de abortos, histórico familiar de câncer e histórico de NIC. Essas informações não foram coletadas do grupo de comparação, pois não constam no prontuário.

3.6.2. Análise do TMA

Para os dados gerados pelo TMA a análise estatística foi realizada usando software Graphpad Prism 5.01. Os resultados foram expressos em médias, medianas, desvios-padrão, frequências e/ou porcentagens. O teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas foi realizado para comparar as variáveis quantitativas entre os grupos.

4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados e discussão serão apresentados em três artigos produzidos como resultados desta tese, seguindo o modelo de formatação do Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. O primeiro, é um artigo original com os resultados das análises genéticas dos SNPs do gene *MASP1*, e o segundo artigo é uma *short communication* com os dados do TMA no câncer cervical. O terceiro artigo faz uma revisão sobre o papel não canônico de componentes do SC em diferentes tipos de cânceres (ANEXO B)

4.1 ARTIGO 1- POLIMORFISMOS DO GENE *MASP1*

***MASP1* polymorphisms associated with cervical cancer and high-grade intraepithelial lesions**

Camila F. Oliveira-Toré¹, Nathalia M.D.L. Signorini¹, Helena Musetti B. S. Plácido, Angelica Beate Winter Boldt², Iara de Messias-Reason¹

Affiliations

¹ Postgraduate Program in Internal Medicine and Health sciences, Molecular Immunopathology Laboratory, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil.

² Postgraduate Program in Genetics, Department of Genetics, Human Molecular Genetics Laboratory, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

Abstract

Introduction: Cervical cancer (CC) is the fourth most common type of cancer in women, whose development depends on the ability of cancer cells to multiply and evade the immune response. Mannose-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) are proteins that play a crucial role in the lectin pathway in the complement system. MASP-1 and MASP-3 are encoded by the *MASP1* gene, and the mRNA of MASP-1 and MASP-3 are highly expressed in the uterine cervix. The aim of this study was to analyze the influence of important single polymorphism nucleotides present in the regulatory regions of the *MASP1* gene of CC, high-grade cervical intraepithelial lesions (CIN) and the progression from these high-grade CIN to CC.

Methods: PCR-SSP multiplex was used to genotype nine SNPs: *rs13094773*, *rs7609662*, *rs13064994* in intron 1, *rs698105*, *rs3864098*, *rs1108450* in intron 2 and *rs72549262*, *rs1109452*, *rs850314* in exon 12, of the *MASP1* gene from 99 CC patients, 219 high-grade CIN, 121 healthy controls and 129 healthy blood donors.

Results: A significant association was observed in CC and high-grade CIN patients with the following *MASP1* haplotypes *GTG_CCC_CCA* (CC – OR:2.42, CI:1.14-5.14; high-grade CIN – OR:18.66, CI:3.51-23.91) and *GTG_CCC_GCG* (CC – OR:4.39, CI:1.92-9.99; high-grade CIN – OR:30.24, CI:4.88-58.29). In patients with progression of high-grade CIN into CC a significant association was seen for the haplotype *GCG_CCC_GCG* (OR:13.50; CI:4.92-26.71).

Conclusion: Our findings suggest a possible role for intron 1, intron 2 e exon 12 haplotypes of *MASP1* in susceptibility to the development of CC, high-grade CIN, as well as the progression of these lesions to CC.

Keywords: mannose-binding lectin-associated serine proteases, gynecological cancer, genetic polymorphism, complement system, cancer progression.

1. Introduction

Cervical cancer (CC) is the fourth most common type of cancer in women worldwide (1), and in Brazil, excluding non-melanoma skin tumors, cervical cancer is the third most common type of cancer among women (2). The evolution and establishment of a tumor are marked by the acquisition of genetic and epigenetic alterations, generating a differential antigenic signature between malignant cells and normal cells. During this process of tumor development, there is a selective pressure on the tumor microenvironment, which allows cancer cells to evade the effects of the Complement System (CS) (3–6).

The protease profile presented by tumors is highly relevant, due to its ability to cleave the cellular matrix, facilitating the process of tumor invasion and metastasis. However, its role is not fully elucidated, due to the high number of protease genes that present different types of mutations in different types of cancers (7). Mannose-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) are proteins that play a crucial role in the Lectin Pathway (LP). The LP is one of the three CS activation pathways, activated by pattern recognition receptors (PRRs) that are associated with MASPs, culminating in the formation of C3 convertase, an enzyme common to the three CS pathways (8).

The *MASP1* gene (ENSG00000127241) encodes by alternative splicing three soluble proteins, MASP-1, MASP-3 and MASP-4 (4). MASP-1 and MASP-3 mRNAs are highly expressed in the liver and uterine cervix (9, 10). There is still not enough evidence that *MASP1* polymorphisms are involved in the pathophysiology and maintenance of CC and high-grade cervical intraepithelial lesions (high-grade CIN), due to the genetic and immune system diversity of patients. In light of these, the aim of this study was to analyze the influence of important single polymorphism nucleotides (SNPs) present in the regulatory regions of the *MASP1* gene on the

pathophysiology of CC, high-grade CIN and the progression of these high-grade lesions. We chose the 9 SNPs located in *MASP1* regulatory regions, such as the intron 1, intron 2 and 3'UTR of exon 12, because they can interfere with the expression rates of both MASP-1 and MASP-3 proteins. Furthermore, were chosen the three SNPs in exon 12 because they are binding targets for miRNAs and can only change the expression rate of MASP-3, and these polymorphisms have been previously associated with Chagas disease (14) and Leprosy (15).

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

The Human Research Ethics Committee of the Erasto Gaertner Hospital protocol number 125417/2016 approved the presented study, and all participants signed the informed consent term. The authors confirm that all methods were carried out following guidelines and regulations.

2.2. Clinical Characterization

In this case-control study, 568 women residing in southern Brazil were included. The patient group is composed of 99 unrelated individuals diagnosed with CC by expert gynecologists. The CC stage was diagnosed by the FIGO classification (16). The group of women with high-grade CIN consists of 219 women; the diagnosis was made by specialists using a technique to distinguish between CIN II and III. Both groups were treated at Hospital Erasto Gaertner (Curitiba, Paraná - Brazil), by the public healthcare system (Sistema Único de Saúde - SUS). Human papillomavirus

(HPV) genotyping was not performed for the group of patients or high-grade CIN because this test is not performed free by SUS.

The control group was composed of 121 healthy unrelated women that undergoes gynecological checkups at the University Hospital of Londrina (Londrina-Paraná, Brazil). This group did not present cervical intraepithelial lesions and/or CC and is negative for infection by oncogenic HPV genotypes. A second control group was included in this study, we call it the comparison group, because the 129 women are voluntary blood donors and self-reported to have no CC, confirmatory tests for high-grade lesions and/or HPV were not performed.

The patients in the groups are not related, they come from the same geographical region, and all the groups have been matched by ethnicity. It was not possible to perform age matching between the groups due to the already expected age difference between the CC group, high-grade CIN and the groups used as controls; however, the data were corrected with appropriate statistical analyses.

2.3 Genotyping of *MASP1* gene

Nine *MASP1* SNPs were evaluated by the multiplex sequence specific amplification method (Multiplex PCR-SSP) through two different reactions. The first genotyping was performed following the reaction already standardized by Mendes (15) and evaluated five polymorphisms: *rs7609662* (G>A) and *rs13064994* (C>T) located in intron 1, and the *rs72549262* (G>C), *rs1109452* (C>T) and *rs850314* (G>A) located in exon 12 (15).

The second genotyping evaluated four polymorphisms, *rs13094773* (A>G) located in intron 1, and *rs698105* (T>C), *rs3864098* (T>C) and *rs1108450* (A>C) located in intron 2. Two specific amplification fragments were generated, one with

731bp: for the rs13094773 + rs698105, and another with 607bp: for the rs3864098 + rs1108450. An amplification control fragment of 500bp of *FCN2* gene was simultaneously generated. The primers sequences are presented in Table 01. The PCR was carried out with 100 ng/ μ L DNA, 25mM of each dNTP , 10 mM of each primer, 50 mM of MgCl₂, 10 μ L 10x Coral Load PCR buffer with 2 gel-tracking dyes (Qiagen®), and 5 U Taq DNA polymerase (GoTaq® DNA Polymerase, Promega, USA), in a final volume of 15 μ L. The amplification protocol starts with a 5-minutes denaturation step at 95°C, followed by 30 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at the specific annealing temperature, and 30 seconds at 72°C, and 5 minutes at 72°C for a final DNA extension step. . The result of the amplifications was observed in transilluminated under blue light after electrophoretic run in a 1.0% agarose gel, containing 2.5 μ l of Sybersafe fluorescent dye (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) in 100 mL of agarose (see agarose gel in Supplementary Figure 1).

Table 1. Sequence of primers and size of fragments produced in the two PCR-SSP multiplex reactions.

Primers Forward		Primers Reverse	
Reaction 1			
Intron 1		Intron 1	
MASP1 rs7609662_Af	5' ATATTTGTTTCATATGTTTGAAACCA 3'	MASP1 rs13064994_Cr	5' TTCTTAAACCAATCTGTGGAAG 3' 730 bp
MASP1 rs7609662_Gf	5' ATATTTGTTTCATATGTTTGAAACCG 3'	MASP1 rs13064994_Tr	5' TTCTTAAACCAATCTGTGGAAA 3' 730 bp
Exon 12			
MASP1 rs72549262_Cf	5' CCCTCTCTCTTAGTGTGATC 3'	MASP1 rs1109452_Tr	5' CGACTAAGTCCCCCATATTCA 3' 365 bp
MASP1 rs72549262_Gf	5' CCCTCTCTCTTAGTGTGATG 3'	MASP1 rs1109452_Cr	5' CGACTAAGTCCCCCATATTTCG 3' 365 bp
		MASP1 rs1109452_Cr2	5' CGACTAAGTCCCCCATATTTG 3' 365 bp
Reaction 2			
Intron1		Intron 2	
MASP1 rs13094773_GF	5' AAGAGAATCAAGAGTTAAATGAG 3'	MASP1 rs698105_TR	5' CCTTGACCTGAATTCATACCA 3' 731 bp
MASP1 rs13094773_AF	5' AAGAGAATCAAGAGTTAAATGAA 3'	MASP1 rs698105_CR	5' CCTTGACCTGAATTCATACCG 3' 731 bp
Intron 2			
MASP1 rs3864098CF	5' TTTAATGTCATATGTCCAACACAC 3'	MASP1 rs1108450AR	5' ATAGGGACCCTCAAGGACCTT 3' 607 bp
MASP1 rs3864098TF	5' TTTAATGTCATATGTCCAACACAT 3'	MASP1 rs1108450CR	5' ATAGGGACCCTCAAGGACCTG 3' 607 bp

Primer control - Reaction 2				
FCN2_EX8_F	5' GCCAGGCCTCAGGTATAAAG 3'	FCN2_EX8_R	5' AAAGGGTTGATTGCGGAAAC 3'	500 bp

bp: base pair;**EX:** exon *MASP1* rs1109452_Cr2 corresponds to another variant (A) of SNP rs850314.

2.4 Statistical Analysis

The allele, genotype and haplotype frequencies were estimated and compared by Chi-Square Distribution Tables with Fisher's corrections using the STATA 9.0 and the SNPStats software (<https://www.snpstats.net/start.htm>). The Hardy–Weinberg equilibrium was tested using the Arlequin v.3.1. The haplotypes were assembled using Excel and these data were confirmed by Arlequin v.3.1, the multiplex SSP PCRs performed allowed a safe assembly of the *MASP1* haplotypes.

The multivariate logistic regression test was performed between the genotype and haplotype frequencies of *MASP1* in all groups for the independent variables age and ethnicity. The choice of the best inheritance model was performed using the Akaike information (AIC) in order to minimize the expected entropy. Analysis of the linkage disequilibrium (Δ') between the *MASP1* SNPs was calculated by the SNPStats software. The EM algorithm or the Markov Chain Monte Carlo method was used for the estimation of haplotypes. All tests were performed at a significance level of 5%.

3. Results

The clinical and demographic description of patients with cervical cancer and high-grade CIN are presented in Table 2. The variable age at diagnosis was significantly different between CC and high-grade CIN ($p < 0.0000001$) (Table 2). Previous history of low-grade CIN was 6% in patients with CC and 10.04% in high-grade CIN (Supplementary Table 2).

Table 2. Clinical and demographic description of groups.

Parameters	Control	Comparison	Cervical Cancer	High-grade CIN	Exact p-value	
n	121	129	99	219		
Age average ± SD	48 ± 12.79	35.89 ± 8.12	52.26 ± 13.52	33.74 ± 6.91	0.0012	C vc CC
					0.002	Cp vs CC
					0.0038	CC vs CIN
Min-Max	18-70	22-58	28-88	22-46		
Ethical background n (%)						
Euro-Brazilian	105 (86.77)	114 (88.37)	85 (85.86)	189 (86.30)	0.068	C vc CC
					0.097	Cp vs CC
					0.083	CC vs CIN
Afro-descendant	16 (13.22)	15 (11.63)	14 (14.14)	30 (13.69)		
Family history of cancer n (%)	19 (15.70)	n.a.	72 (72.83)	82 (37.44)		
History of previous cervical intraepithelial lesions n (%)						
CIN I	0	n.a.	6 (0.06)	22 (10.04)		
CIN II ou CIN III	0	n.a.	34 (0.34)	n.ap.		

CIN: cervical intraepithelial lesion; **C:** control group; **Cp:** comparison group; **SD:** standard deviation; **%:** percentage; **Min:** minimum age; **Max:** maximum age; **n.a.:** not available; **n.ap.:** not applicable

The genotypic frequency distribution of all SNPs and haplotypes were in the Hardy–Weinberg equilibrium in all analyzed groups. The allelic and genotypic frequencies are in Supplementary Table 1. No association was observed among the history of cancer in the family ($p=0.634$), previous presence of high-grade CIN ($p=0.687$), FIGO stages ($p=0.457$), smoker history ($p=0.571$) and adenocarcinoma or squamous cell carcinoma ($p=0.873$) with *MASP1* SNPs.

The susceptibility analysis of the investigated alleles showed five positive associations with CC development. Two SNPs located in intron 1, *rs13094773*G* and *rs13064994*T*, and three in the exon 12, *rs72549262*C*, *rs1109452*C* and the *rs850314*A* (Table 3). Three alleles indicated susceptibility to high-grade CIN development, two in intron 1, *rs13094773*G* and *rs13064994*T* and one allele in exon 12, *rs72549262*C* (Table 3). Association between alleles and progression from high-grade CIN to CC indicated three susceptibility alleles, the *rs13064994*T*, *rs1109452*C* and the *rs850314*A* (Supplementary table 1).

The *rs1109452*C* and *rs850314*A* alleles of exon 12 are in complete linkage disequilibrium (LD=1.00; $p<0.05$). In intron 1, *rs13094773*, *rs7609662* and *rs13064994* showed high linkage disequilibrium: *rs13094773_rs7609662* (LD=0.897; $p<0.05$), between *rs13094773_rs13064994* (LD=0.825; $p<0.05$). Similarly, in intron 2 the SNPs *rs698105_rs3864098* (LD=0.882; $p<0.05$), *rs698105_rs1108450* (LD=0.838; $p<0.05$), and between *rs1108450_rs3864098* (LD=0.926; $p<0.05$).

3.1. Association between *MASP1* haplotypes

In order to analyze the influence of *MASP1* polymorphisms on susceptibility/protection in the development of cervical cancer, high-grade CIN and on the progression of these lesions to cancer the studied SNPs were assembled to form haplotypes. We analyzed the haplotypes with a frequency $\geq 5\%$ and significant p-value ($p\leq 0.05$), and for the assembly of the haplotypes we followed the order of location of the SNPs in the *MASP1* gene. We analyzed possible associations between the SNPs present in the same intron or exon, as

shown in the Table 4. The p-values were adjusted for age and ethnicity by logistic regression.

For the assembly of intron 1 polymorphisms, seven haplotypes were generated, *AAC*, *AGC*, *AGT*, *GAC*, *GGC*, *GAT*, and *GGT* (data shown only for haplotypes with frequency >5% or p-value significant). For the intron 2 polymorphisms, there were six haplotypes, *CCA*, *CCC*, *CTA*, *TTA*, *TTC* and *TCC* (data shown only for haplotypes with frequency >5% or p-value significant). In addition, for exon 12 polymorphisms four haplotypes were generated, *CCA*, *CTG*, *CCG* and *GTG* (Table 3). The combinations of the most frequent *MASP1* SNPs in the all groups are named in table 3. The association data of the most frequent and statistically significant haplotypes are showed in table 4.

Table 3. Haplotype assembly identification with the most frequent SNPs of *MASP1*

Intron 1	<i>rs7609662</i>	<i>rs13064994</i>	<i>rs13094773</i>	Matching number	Control n (%) n=121	Comparison n (%) n=129	CC n (%) n=99	High-grade CIN n (%) n=219
	G	C	A	Int1_1	124 (51.24)	126 (49.00)	52 (26.25)	153 (35.00)
	G	T	G	Int1_2	67 (27.69)	57 (22.28)	45 (22.75)	108 (24.68)
	A	C	A	Int1_3	39 (16.12)	43 (16.67)	40 (20.30)	102 (23.31)
	G	C	G	Int1_4	12 (4.90)	12 (4.78)	14 (7.03)	72 (16.46)
Intron 2	<i>rs698105</i>	<i>rs3864098</i>	<i>rs1108450</i>					
	C	T	A	Int2_1	186 (76.94)	191 (74.14)	130 (65.63)	242 (55.72)
	C	C	C	Int2_2	12 (4.88)	15 (5.19)	44 (22.12)	97 (22.18)
Exon 12	<i>rs72549262</i>	<i>rs1109452</i>	<i>rs850314</i>					
	G	C	G	Ex12_1	92 (38.12)	102 (39.58)	64 (32.30)	154 (35.17)
	C	T	G	Ex12_2	50 (20.64)	56 (21.70)	26 (13.14)	44 (10.04)
	C	C	A	Ex12_3	14 (5.79)	54 (20.93)	98 (49.51)	188 (42.92)
	G	T	G	Ex12_4	27 (11.02)	26 (10.20)	10 (5.05)	52 (11.87)

*haplotypes with frequency > 10% at least one of the groups. p-value adjusted by age and ethnicity; **CC**: cervical cancer; **CIN**: cervical intraepithelial neoplasia. The sequence of the SNPs follows the order of the alleles in the *MASP1* gene

3.1.1 Intron 1 haplotype associations

The *Int1_3* is a protection factor for CC (Table 4), and for the development of high-grade CIN (Table 4). The *Int1_1* is only a protective factor against the progression of high-grade CIN (Table 4). *Int1_4* and *Int1_2* were significantly associated with both CC and high-grade CIN (Table 4).

A significant association was observed in CC and high-grade CIN patients with the following *MASP1* haplotypes *GTG_CCC_CCA* (CC – OR:2.42, CI:1.14-5.14; high-grade CIN – OR:18.66, CI:3.51-23.91) and *GTG_CCC_GCG* (CC – OR:4.39, CI:1.92-9.99; high-grade CIN – OR:30.24, CI:4.88-58.29). In patients with progression of high-grade CIN into CC a significant association was seen for the haplotype *GCG_CCC_GCG* (OR:13.50; CI:4.92-26.71).

Table 4. Haplotype association for the *MASP1* gene polymorphism in cervical cancer and high-grade cervical epithelial neoplasia.

	C vs CC p-value* OR [95%CI]	C vs high-grade CIN p-value* OR [95%CI]	Progression CC vs High-grade CIN p-value* OR [95%CI]
Intron 1			
<i>Int1_1</i>	n.s.	n.s.	0.001 0.10 [0.04-0.41]
<i>Int1_2</i>	n.s.	0.0096 1.73 [1.14-2.59]	n.s.
<i>Int1_3</i>	0.0001 0.10 [0.04-0.25]	0.0001 0.12 [0.07-0.19]	n.s.
<i>Int1_4</i>	<0.0001 7.81 [3.63-16.79]	0.0022 2.30 [1.35-3.91]	n.s.
Intron 2			
<i>Int2_1</i>	n.s.	0.0001 0.15 [0.13-0.60]	n.s.
<i>Int2_2</i>	n.s.	<0.0001 4.44 [2.39-8.60]	n.s.
Exon 12			
<i>Ex12_4</i>	0.002 0.24 [0.10-0.60]	n.s.	0.0001 0.17 [0.13-0.37]
<i>Ex12_3</i>	0.002 2.67 [1.43-4.99]	n.s.	0.009 2.85 [1.16-5.18]
<i>Ex12_1</i>	0.0001 3.25 [1.70-6.18]	0.002 2.07 [1.30-3.10]	n.s.
Intron1_Intron2_Exon12			
<i>Int1_1_Int2_1_Ex12_4</i>	n.s.	0.0001 0.02 [0.01-0.16]	n.s.
<i>Int1_1_Int2_1_Ex12_2</i>	n.s.	0.0001 0.20 [0.11-0.34]	n.s.
<i>Int1_4_Int2_2_Ex12_1</i>	n.s.	n.s.	0.01 13.5 [4.92-26.71]

<i>Int1_3_Int2_1_Ex12_2</i>	0.0001 0.20 [0.10-0.43]	0.012 0.07 [0.02-0.55]	n.s.
<i>Int1_4_Int2_2_Ex12_1</i>	n.s.	0.007 15.67 [3.09-27.26]	n.s.
<i>Int1_4_Int2_2_Ex12_2</i>	n.s.	0.019 11.40 [1.51-36.48]	n.s.
<i>Int1_2_Int2_2_Ex12_3</i>	0.021 2.42 [1.14-5.14]	0.004 18.66 [3.51-23.91]	n.s.
<i>Int1_2_Int2_2_Ex12_1</i>	0.0001 4.39 [1.92-9.99]	0.0001 30.24 [4.88-58.29]	n.s.

*: p-value adjusted by age and ethnicity; **C**: control group; **CC**: cervical cancer; **CIN**: cervical intraepithelial neoplasia; **n.s.**: not significant; **OR**: odds ratio; **CI**: confidential interval.

3.1.2 Intron 2 haplotype associations

Of the intron 2 haplotypes, two were associated with susceptibility to high-grade CIN, the *Int2_3* and *Int2_2* (Table 4). Only the *Int2_1* is a protective factor for the development of high-grade CIN (Table 4). Haplotypes from this gene region were not associated with the development of cervical cancer or lesion progression ($p>0.05$).

3.1.3 Association of exon 12 haplotypes

The *Ex12_3* confers susceptibility to the development of CC; as well as contributes to the progression of high-grade cervical lesions to cancer. The *Ex12_1* is a susceptibility factor for both high-grade CIN and CC. The *Ex12_4* confers protection for the development of CC and the progression of lesions to the CC (Table 4).

3.1.4 Intron1_intron2_exon 12 haplotype associations

The haplotype analysis showed is *Int1_1_Int2_1_Ex12_2* as a protector factor only for the development of high-grade CIN (Table 4). In addition, *Int1_1_Int2_1_Ex12_2* was protection for both CC and high-grade CIN. On the other hand, *Int1_4_Int2_2_Ex12_1* confer susceptibility to high-grade CIN, while *Int1_2_Int2_2_Ex12_3* and *Int1_2_Int2_2_Ex12_1* to high-grade CIN and CC, respectively. The haplotypes *Int1_4_Int2_2_Ex12_3* and *Int1_4_Int2_2_Ex12_1*

confer patients with a high-grade CIN high susceptibility to progression to CC (Table 4).

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study evaluating *MASP1* gene polymorphisms in the immunopathogenesis of high-grade cervical intraepithelial lesions and cervical cancer. Polymorphisms in the regulatory regions of *MASP1* may significantly contribute to the development of cervical cancer, high-grade CIN, and the progression of these lesions to CC, through an epigenetic mechanism of alteration in the affinity of miRNAs 381 and 261 for the 3' region UTR of exon 12 of *MASP1* mRNA.

The *MASP1* gene generates 18 transcripts, of which only two correspond to two functional proteins with central roles in the proteolytic cascade of the CS (9,17–19). Thus, MASP-1 contributes to the exacerbation of complement activation and MASP-3 exhibits two distinct roles, it may downregulate the LP (9,20–22) and in the alternative pathway MASP-3 regulates positively, cleaving the pro-factor-D (23). However, these proteins have roles in pathways outside the complement, such as the coagulation cascade and intracellular pathways (15,24-27). To ensure genetic conservation, the *MASP1* gene has a low number of genetic polymorphisms, in addition, the gene has a regulatory region with unmethylated CpG sites that extend from the gene promoter to intron 2 (15). This regulatory region also has high levels of histone 3 acetylated lysine27 (H3K27), a histone modification typical of expressed genes (26). The alterations in transcription factor binding sites, in acetylated histone regions, considerably alter the transcription rate of the gene and/or which transcript to be expressed, in this way, the analysis of SNPs in regulatory regions of this gene may provide important information on the expression profile of MASPs isoforms in CC (27).

The normal uterine cervix shows high levels of expression of MASP-1 and MASP-3 transcripts; however, these levels are extremely low in tumor tissues (32). Our genetic data suggest that changes in the expression profile of MASPs mRNA and MASPs levels are associated with susceptibility to the development of CC, high-grade CIN, as well as the progression of these lesions to CC. As susceptibility factors, the *Int1_2_Int2_2_Ex12_3* and *Int1_2_Int2_3_Ex12_1* for both CC and high-grade CIN, while the *Int1_4_Int2_2_Ex12_1* is susceptibility factors increasing the chances of developing only high-grade CIN by more than 10 times.

The intron1 *Int1_2* increases the chances of a healthy woman developing CC and high-grade CIN, which may be due to an increase in MASP-1 and a decrease in MASP-3. The *rs13064994*T* alleles have already been associated with higher levels of *MASP1* mRNA in several normal tissues (15), while the *rs13094773*G* with lower serum MASP-3 concentrations (15,28). In addition, these SNPs are at high LD.

SNPs located in intron 1 may influence the high expression of MASP-1 and the low expression of MASP-3 in CC and high-grade CIN. In agreement with our data, alterations in the *MASP1* mRNA expression rates (29) and serum levels of MASP-1 and MASP-3 (30) have already been described. Maestri and colleagues (30) observed LP activation in CC, with high levels of serum MASP-1, but no significant difference in the levels of MASP-3 and MAP44 (30). Kong and colleagues report increased expression of *MASP1* mRNA levels in CC tumor tissue when compared to adjacent normal tissue, but there was no significant association between high rates of *MASP1* and patient survival rate (29).

In female tissues, MASP-3 is the most expressed transcript (31). The increase in *MASP1* mRNA observed by Kong may only be relative to the MASP-1 transcript (ENST337774.10) (29), since high MASP-1 serum concentrations have already been

associated with CC (30) and there is a decrease in *MASP-3* mRNA rates at the tumor site in CC (32). Therefore, our data show that the intron1 *Int1_2* may influence the differential expression between *MASP1* transcripts, which *MASP-1* is overexpressed and *MASP-3* is poorly expressed.

High-grade CIN has a high probability of progression to CC; their treatment contributes to a reproductive risk to the patient and increases the chances of progression to cervical cancer by three times compared to women with a history of high-grade CIN. Infection with high-risk HPV genotypes is one of the most important risk factors associated with the CIN (33). However, even in sexually active women, some of them will not develop high-grade CIN (34), highlighting other cofactors involved in the development of CIN. Such cofactors involve a balanced dynamic between environment, HPV characteristics, immunological response and the genetic profile.

The intron2 *Int2_2* increases the risk of developing high-grade CIN almost 5-fold, the *rs698105**C and *rs3864098**C alleles lead to a decrease in *MASP-3* levels, but increase the levels of *MASP1* mRNA (GTEx Portal). Interestingly, this haplotype was associated only with the development of high-grade CIN; our hypothesis is that women who carry this haplotype have high levels of *MASP-1* and low levels of *MASP-3*, generating a hyperactive activation of the complement system in response to persistent infection by HPV.

The increase in *MASP-1 mRNA* has been described in other types of cancer, high level of the *MASP1* gene was reported in lung squamous cell carcinoma, and they suggest that *MASP1* may be a new candidate for a target gene and may be associated with phenotypic properties that differentiate the early stages of this cancer (35). This increase in *MASP1* mRNA in lung cancer tissue can be explained in part by

the broad role of MASP-1 in complement and in the coagulation cascade (35,36), where both contribute to the maintenance of the intense inflammatory process of the tumor microenvironment (37). In the same way, Kuraya and colleagues observed high levels of *MASP-1* and *MASP-3* *mRNAs* in T98G glioma cell lines, and a significant increase in the secretion of MASP-1 and MASP-3 by cell culture (39). However, the significant increase in the expression of Ficolin-2 observed by Kuraya shows that an exacerbated activation of the lectin pathway is occurring *in vitro* (39). Furthermore, the glioma is the only cancer tissue that shows high expression of *MASP1* mRNA (10,32)

Although there is no pathophysiological correlation between progressions from high-grade CIN to CC, the positively associated blocks of intron1_intron2 haplotypes are not the same for patients with CC and high-grade CIN, nor for the progression of these lesions to CC, showing that there is a distinct genetic profile among these diseases. In this way, the investigation of these polymorphisms in women can contribute to a more effective diagnosis and follow-up.

The *MASP1* gene has 18 exons, exons 1 to 9 are shared between MASP-1 and MASP-3 proteins, but the serine protease (SP) domain of each of them is transcribed by different exons, exon 12 is exclusive to the domain SP of MASP-3 (19,21). The *rs72549262*, *rs1109452* and *rs850314* are polymorphisms of the 3'UTR region of exon 12 of *MASP1*, and in this study, the exon12 *Ex12_1* and *Ex12_3* were associated with susceptibility to CC, high-grade CIN and the progression of these lesions to CC.

The *rs1109452* and *rs850314* are adjacent to each other in the gene and in a region with the CpG site downstream of exon 12 (15). The *rs1109452_rs850314**CG combination represents the ancestral combination and maintains genetic stability, while the minor and *rs1109452_rs850314**TA alleles cause disruption of 5'CpG3' site (15). The cytosine of this CpG site was methylated in the brain, but not in the cell lines

of the liver and female reproductive tissue, where it has high production of MASP-3 mRNA (15). In the epigenetic mechanism, DNA methylation in alternatively spliced exons can modulate the inclusion of exons, causing increased mRNA expression of the *MASP1* isoforms (15).

In cervix normal tissue the MASP-3 are higher expressed, nevertheless are poorly expressed in CC tissue (32). The associated exon 12 *Ex12_3* and *Ex12_1* may play important roles in *MASP-3* mRNA expression levels, leading to high susceptibility to CC. The biological mechanism involved in this susceptibility may be an epigenetic control through the regulation of *MASP1* of miRNAs. As predicted *in silico* using targetScan 7.1, combinations of CA and CG are targets for miRNA and may reduce MASP-3 translation rates (15). Among the miRNAs predicted to recognize these 3'UTR polymorphic sites, miR-3181 preferentially recognizes the *rs1109452_rs850314*CG* combination, and miR-2861 binds to *rs1109452_rs850314*CA* (15).

The miR-2861 has been already associated with diagnosis of the CC and CIN, which shows that CC patients have a decrease in miR-2861 in serum (38). The *rs1109452_rs850314*CA* haplotype appears to influence down regulates expression of *MASP-3* mRNA (15), however further investigation is necessary to confirm these alterations in CC. The miR-318 has as target the MET oncogene leading to dysregulation of intracellular pathways such as PI3K and RAS, favoring cell survival, cell migration and invasion (41). Downregulation of *MASP1* transcripts - in specific MASP-3 - due to miR-318 may affect these intracellular pathways contributing to the development of CC.

Fraile et al. Observed a tumor suppressor role of MASP-3 in colon cancer, in which the expression of MASP-3 mRNA was reduced by 2000-fold in tumor tissues

(7). Moreover, the re-expression of this protein in animal models caused a decrease in tumor proliferation (7). Other CS proteases were not significant (7), suggesting that MASP-3 may play other roles beyond those already described in CS.

Hence, our data suggest that *MASP1 Ex12_1* and *Ex12_3* associated with CC susceptibility, high-grade CIN, and progression of these lesions, have *MASP-3* mRNA suppression effects. The MASP-3 suppression in CC may be due to its proteolytic activity towards insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP-5) (40), since IGFBP-5 plays a crucial role in pathways cells important for the establishment of a viable tumor microenvironment, such as cell survival, cell differentiation and apoptosis (40).

The susceptibility haplotypes of intron 1, intron 2 and exon 12 may imply significant alterations when analyzed in a single block combination of these three genetic positions. Our findings showed that the haplotypes associated with CC are not those associated with high-grade CIN or the progression of CC lesions, suggesting that there is a distinct genetic pattern of SNPs in the *MASP1* gene that confers susceptibility. The susceptibility observed in the analyzed haplotypes may be due to the increased expression of MASP-1 and decreased of MASP-3 caused by the accumulative effects of the SNPs of intron 1 and intron 2 with the epigenetic regulation that occurs in the 3'UTR region of exon 12 by miRNAs.

Our study has some limitations, which include the small sample size of patients with CC, control and comparison groups, in this way, adequate static tests were performed for corrections in the sample size. Future studies including investigation of MASP-1 and MASP-3 mRNA levels are needed about the role of intron 1, intron 2 and exon 12 polymorphisms of the *MASP1* gene in the development of CC and high-grade CIN.

In summary, our findings suggest a role for haplotypes *Int1_2_Int2_2_Ex12_3*, *Int1_2_Int2_2_Ex12_1* and *Int1_4_Int2_2_Ex12_1* the *MASP1* gene in susceptibility to CC and high-grade CIN, possibly by affecting the expression of MASP-1 and MASP-3. These results can contribute to a better understanding of the immune mechanism associated with a complex interaction of pathways in the establishment of cervical cancer, high-grade cervical lesions and the evolution of these lesions into cancer.

5. Conflict of Interest

All authors state that potential conflicts do not exist.

6. Acknowledgement

We thank Dr. Karen Brajão from Universidade Estadual de Londrina for providing us with DNA samples from the control group, Dr. Amarilis Giaretta de Moares for her contribution in correcting the writing of the article, to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for financial support. To the Graduate Program in Internal Medicine and Health Sciences – Federal University of Paraná and to the Laboratory of Molecular Immunopathology (LIPM – Federal University of Paraná).

6. Financial support

This work was funded by CNPq (scholarship for CFO-T - 40001016012P1), and CAPES (CAPES/PROAP - Financial Code 001) by scholarships (NMDLS - 40001016012P1 and HMBSP - 134403/2020-7).

7. References

1. WHO. Cervical cancer. **World Health Organization**. 2019. Available from: <https://www.who.int/health-topics/cervical-cancer>.
2. INCA. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Ministério da Saúde. **INCA**. 2016;33:81–87. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/rastreamento_cancer_colo_uterio.pdf.
3. Quail DF, Taylor MJ, Postovit LM. Microenvironmental Regulation of Cancer Stem Cell Phenotypes. **Curr Stem Cell Res Ther**. 2012;7(3):197–216. Available from: <http://doi.org/10.2174/157488812799859838>.
4. Pio R, Ajona D, Lambris JD. Seminars in Immunology Complement inhibition in cancer therapy. **Semin Immunol**. 2013;25(1):54–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2013.04.001>.
5. Reis ES, Mastellos DC, Ricklin D, Mantovani A, Lambris JD. Complement in cancer: **Nature Rev Immunol**. 2017;18:5–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2017.97>.
6. Spurgeon ME, Lambert PF. Human Papillomavirus and the Stroma: Bidirectional Crosstalk during the Virus Life Cycle. **Viruses**. 2017;9(8):219. Available from: <http://doi.org/10.3390/v9080219>.
7. Fraile JM, Ordóñez GR, Quirós PM, Astudillo A, Galván A, Colomer D, *et al*. Identification of novel tumor suppressor degradome profiling of colorectal carcinomas proteases by degradome profiling of colorectal carcinomas. **Oncotarget**. 2013;4(11):1999–1932. Available from: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1303>.
8. Boldt, Beate AW, Epp S, Catarino SJ. Encyclopedia of Signaling Molecules. **Springer**. 2016. Available from: http://doi.org/10.1007/978-1-4614-6438-9_101714-1.
9. Degn SE, Hansen AG, Steffensen R, Jacobsen C, Jensenius JC, Thiel S, *et al*. MAP44, a Human Protein Associated with Pattern Recognition Molecules of the Complement System and Regulating the Lectin Pathway of Complement Activation. **J Immunol**. 2009;183:7371–7378. Available from: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902388>.
10. Genotype-Tissue Expression (GTEx) Portal. Broad Inst MIT & Harvard. **GTEx**. Available from: <https://www.gtexportal.org/home/>.
11. Gajek G, Świerzko AS, Cedzyński M. Association of polymorphisms of *MASP1/3*, *COLEC10*, and *COLEC11* genes with 3MC syndrome. **Int J Mol Sci**. 2020;21(15):1–14. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms21155483>.
12. Cancer (n.d.). **World Health Organization**. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
13. Rooryck C, Diaz-font A, Osborn DPS, Chabchoub E, Shamseldin H, Kenny J, *et al*. Mutations in the lectin complement pathway genes *COLEC11* and *MASP1* cause 3MC syndrome. **Nat Gent**. 2011;43(3):197–203. Available from: <http://doi.org/10.1038/ng.757>.
14. Cavalcanti EO, Lidani KCF, Oliveira-Toré C de F, Messias-Reason IJ de, Andrade FA. *MASP1* Gene Polymorphism and MASP-3 Serum Levels in Patients with Chronic Chagas Disease. **Immunol Invest**. 2022;51(7):2108–2121. Available from: <https://doi.org/10.1080/08820139.2022.2110503>.
15. Mendes HW, Boldt ABW, Stahlke E von RS, Jensenius JC, Thiel S, Messias-Reason IJT. Adding *MASP1* to the lectin pathway—leprosy association puzzle: Hints from

- gene polymorphisms and protein levels. **PLoS Negl Trop Dis**. 2020;14(4):1–20. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007534>.
16. Olawaiye AB, Cotler J, Cuello MA, Bhatla N, Okamoto A, Wilailak S, *et al*. FIGO staging for carcinoma of the vulva: 2021 revision. **Int J Gynec Obstet**. 2021;155(1):43–7. Available from: <https://doi.org/10.1002/ijgo.13880>
 17. Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita T, Willis AC, Christensen T, *et al*. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. **Immunity**. 2001;15(1):127–35. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00161-3).
 18. Skjoedt MO, Hummelshoj T, Palarasah Y, Honore C, Koch C, Skjodt K, *et al*. A Novel Mannose-binding Lectin/Ficolin-associated Protein Is Highly Expressed in Heart and Skeletal Muscle Tissues and Inhibits Complement Activation*. **J Biol Chem**. 2010;285(11):8234–8243. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065805>.
 19. Degen SE, Jensenius JC, Thiel S. Disease-Causing Mutations in Genes of the Complement System. **Am J Hum Genet**. 2011;88(6):689–705. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.05.011>.
 20. Andrade FA, Lidiani KCF, Catarino SJ, Messias-Reason I. Serine Proteases in the Lectin Pathway of the Complement System. **Springer Nature Singapore. Proteases in Physiology and Pathology**. 2017;397-420. Available from: [10.1007/978-981-10-2513-6_18](https://doi.org/10.1007/978-981-10-2513-6_18).
 21. Boldt ABW, Boschmann SE, Catarino SJ, Andrade FA, Messias-Reason I. Encyclopedia of Signaling Molecules. **Springer**. 2018;2972–2989. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4>.
 22. Skjoedt M, Palarasah Y, Munthe-Fog L, Jie Y, Weiss G, Skjodt K, *et al*. MBL-associated serine protease-3 circulates in high serum concentrations predominantly in complex with Ficolin-3 and regulates Ficolin-3 mediated. **Immunobiology**. 2010;215(11):921–931. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2009.10.006>.
 23. Dobó J, Szakács D, Oroszlán G, Kortvely E, Kiss B, Boros E, *et al*. MASP-3 is the exclusive pro-factor D activator in resting blood: The lectin and the alternative complement pathways are fundamentally linked. **Sci Rep**. 2016;6:1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep31877>.
 24. Nonaka M, Miyazawa S. Evolution of the initiating enzymes of the complement system. **Genome Biol**. 2001;3(1). Available from: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2001-3-1-reviews1001>.
 25. Kimura A, Sakaguchi E, Nonaka M. Multi-component complement system of Cnidaria: C3, Bf, and MASP genes expressed in the endodermal tissues of a sea anemone, *Nematostella vectensis*. **Immunobiology**. 2009;214(3):165–78. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.01.003>.
 26. UCSC Genomic. University of California. **UCSC**. 2022. Available from: <https://genome.ucsc.edu>.
 27. Flavahan WA, Gaskell E, Bernstein BE. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. **Sci**. 2017;357(6348):eaal2380. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.aal2380>.
 28. Bumiller-Bini V, Cipolla GA, de Almeida RC, Petzl-Erler ML, Augusto DG, Boldt ABW. Sparking fire under the skin? Answers from the association of complement genes with pemphigus foliaceus. **Front Immunol**. 2018;9:695. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00695>.
 29. Kong L, Wang J, Cheng J, Zang C, Chen F, Wang W, *et al*. Comprehensive Identification of the Human Secretome as Potential Indicators in Treatment Outcome

- of HPV-Positive and -Negative Cervical Cancer Patients. **Gynecol Obstet Invest.** 2020;85(5):405–415. Available from: <https://doi.org/10.1159/000510713>.
30. Maestri CA, Nisihara R, Mendes HW, Mitchell DA. MASP-1 and MASP-2 Serum Levels Are Associated With Worse Prognostic in Cervical Cancer Progression. **Front Immunol.** 2018;9:1–5. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02742>.
 31. Ensembl Release 108. **Ensembl Genomes.** 2022. Available from: <http://www.ensembl.org/>.
 32. The Human Protein Atlas. Knut & Alice Wallenberg foundation. **Human Protein Atlas.** 2022. Available from: <https://www.proteinatlas.org>.
 33. Causin RL, de Freitas AJA, Filho CMTH, dos Reis R, Reis RM, Marques MMC. A systematic review of micrnas involved in cervical cancer progression. *Cells.* 2021;10(3):1–15. Available from: <https://doi.org/10.3390/cells10030668>.
 34. Aidé S, Almeida G, do Val I, Vespa Junior N, Campaner AB. Neoplasia intraepithelial cervical. **J Bras Doenças Sex Transm.** 2009;21(4):166–170. Available from: <https://www.bjstd.org/revista/article/view/1000/895>.
 35. Kang JU, Koo SH, Kwon KC, Park JW, Kim JM. Identification of novel candidate target genes, including EPHB3, *MASP1* and SST at 3q26.2-q29 in squamous cell carcinoma of the lung. **BMC Cancer.** 2009;9:1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-237>.
 36. Dobó J, Schroeder V, Jenny L, Cervenak L, Závodszky P, Gál P. Multiple roles of complement MASP-1 at the interface of innate immune response and coagulation. **Mol Immunol.** 2014;61(2):69–78. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.05.013>.
 37. Zhang R, Liu Q, Li T, Liao Q, Zhao Y. Role of the complement system in the tumor microenvironment. **Cancer Cell Int.** 2019;19:300. Available from: <http://doi.org/10.1186/s12935-019-1027-3>.
 38. Zhang Y, Zhang D, Wang F, Xu D, Guo Y, Cui W. Serum miRNAs panel (miR-16-2*, miR-195, miR-2861, miR-497) as novel non-invasive biomarkers for detection of cervical cancer. **Sci Rep.** 2015;14(5)17942. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep17942>.
 39. KURAYA, M et al. Expression of H-@colin/Hakata antigen, mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and MASP-3 by human glioma cell line T98G. v. 15(1), n.109-17,jan 2003.
 40. Cortesio CL, Jiang W. Mannan-binding lectin-associated serine protease 3 cleaves synthetic peptides and insulin-like growth factor-binding protein 5. **Arch Biochem Biophys.** 2006;449(1–2):164–170. Available from: <http://doi.org/10.1016/j.abb.2006.02.006>.
 41. Slattery ML, Herrick JS, Mullany LE, Samowitz WS, Sevens JR, Sokoda L, Wolff RK. The co-regulatory networks of tumor suppressor genes, oncogenes, and miRNAs in colorectal cancer. **Genes Chromosomes Cancer.** 2017 Nov;56(11):769-787. Available from: [doi: 10.1002/gcc.22481](https://doi.org/10.1002/gcc.22481). Epub 2017 Jul 30.

Supplementary materials

Supplementary Table 1. Allelic and genotypic frequencies and association for the *MASP1* gene polymorphism in cervical cancer and high-grade cervical epithelial neoplasia.

dbSNP	Control n (%) n=121	Comparison n (%) n=129	CC n (%) n=99	High-grade CIN n (%) n=219	p-value& OR [95%CI] Co vs CC	p-value& OR [95%CI] Co vs High- grade CIN	p-value& OR [95%CI] Cp vs CC	p-value& OR [95%CI] Cp vs High- grade CIN	p-value& OR [95%CI] CC vs High- grade CIN
Intron 1									
rs7609662									
G*	203 (84)	214 (83)	158 (81)	331 (81)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A	49 (16)	44 (17)	36 (19)	79 (19)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G/G	77 (64)	79 (62)	64 (66)	135 (66)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G/A	35 (29)	44 (34)	30 (31)	61 (30)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A/A	9 (7)	5 (4)	3 (3)	9 (4)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
rs13064994									
C*	174 (72)	196 (76)	127 (64)	328 (0.75)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
T	68 (28)	62 (24)	71 (36)	110 (0.25)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
C/C	59 (49)	76 (59)	42 (43)	127 (58)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
C/T	57 (47)	44 (34)	41 (42)	73 (33)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.018 1.72 [1.06-2.79]
T/T	5 (4)	9 (7)	16 (15)	19 (9)	4.16 [1.44-12.01]	0.013	n.s.	0.011	0.024 0.018 2.38 [1.16-4.89]
rs13094773									
A*	163 (67)	174 (67)	93 (47)	258 (59)	0.43 [0.29-0.63]	0.0002	0.035	<0.0001	0.03 0.62 [0.51-0.86]

G	79 (33)	84 (33)	105 (53)	180 (41)	0.0002	0.035	<0.0001	0.03	0.006
					2.35 [1.58-3.44]	1.44 [1.04-2.00]	2.33 [1.60-3.43]	1.44 [1.05-1.99]	1.62 [1.15-2.27]
A/A	59 (67)	62 (48)	24 (24)	70 (32)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A/G	45 (37)	50 (39)	45 (46)	119 (54)	<0.001	n.s.	n.s.	0.0081	n.s.
					2.58 [1.42-4.68]			2.11 [1.31-3.39]	
G/G	17 (14)	17 (13)	30 (30)	30 (14)	<0.001	n.s.	n.s.	n.s.	0.0021
					4.46 [2.15-9.27]				2.90 [1.52-5.56]
Intron 2									
rs698105									
T*	33 (14)	42 (16)	164 (83)	52 (12)	<0.000001	n.s.	<0.000001	n.s	<0.000001
					27.42 [16.4-46.9]		24.55 [16.4-46.9]		35.46 [21.86-58.96]
C	209 (86)	216 (84)	34 (17)	386 (88)	<0.000001	n.s.	<0.000001	n.s	<0.000001
					0.037 [0.02-0.06]		0.04 [0.02-0.06]		0.03 [0.01-0.04]
T/T	3 (2)	6 (5)	0	3 (1)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
T/C	27 (22)	30 (23)	34 (34)	41 (20)	0.014	n.s.	n.s.	n.s.	0.0028
					1.88 [1.05-3.36]				2.24 [1.33-3.77]
C/C	91 (75)	93 (72)	65 (66)	165 (79)	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.
rs3864098									
T*	164 (0.68)	214 (83)	149 (75)	318 (73)	n.s.	n.s.	0.006	0.002	n.s.
							0.52 [0.33-0.82]	0.54 [0.37-0.79]	
C	78 (0.32)	44 (17)	49 (25)	120 (27)	n.s.	n.s.	0.006	0.002	n.s.
							1.89 [1.21-2.96]	1.33 [1.24-2.70]	
T/T	58 (0.48)	88 (68)	56 (57)	118 (54)	n.s.	n.s.	0.044	n.s.	n.s
							0.62 [0.39-0.98]		
T/C	48 (0.40)	38 (29)	37 (37)	82 (37)	n.s.	n.s.	0.0004	0.008	n.s
							1.92 [1.12-3.29]	1.84 [1.16-2.90]	

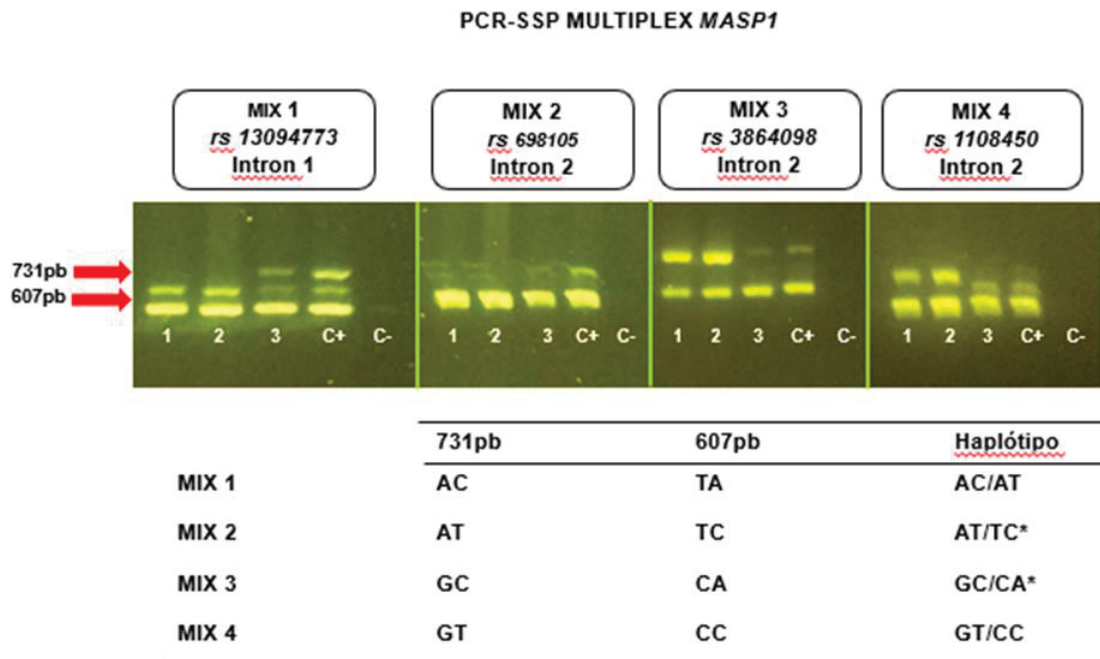
T	97 (0.40)	49 (25)	42 (21)	170 (41)	0.00002 0.40 [0.26-0.61]	n.s.	n.s.	n.s.	<0.00001 0.40 [0.26-0.57]
C/C	39 (0.32)	24 (0.19)	64 (0.59)	78 (0.38)	0.002 2.40 [1.39- 3.82]	n.s.	0.0001 5.79 [3.20-10.50]	0.0001 6.36 [3.53-11.43]	0.002 3.20 [1.55- 6.59]
C/T	67 (0.55)	65 (0.51)	37 (0.34)	90 (0.43)	0.0002 0.34 [0.19-0.59]	0.018 0.51 [0.21-0.86]	<0.001 0.23 [0.12-0.43]	0.0009 0.43 [0.24-0.74]	0.001 2.88 [1.79- 4.65]
T/T	15 (0.12)	38 (0.30)	7 (0.06)	40 (0.19)	0.0002 0.28 [0.11-0.76]	n.s.	0.001 0.22 [0.09-0.54]	0.0009 0.32 [0.17-0.61]	0.010 0.35 [0.15-0.77]
rs850314									
A	38 (0.16)	26 (0.10)	155 (79)	54 (0.13)	<0.0000001 20.1 [12.45-33.11]	n.s.	<0.0000001 32.37 [19.45-56.62]	n.s.	<0.0000001 25.13 [16.2-39.7]
G*	204 (84)	228 (0.90)	41 (21)	362 (0.87)	<0.0000001 0.05 [0.03-0.08]	n.s.	<0.0000001 0.03 [0.01-0.05]	n.s.	<0.0000001 0.04 [0.02-0.06]
A/A	3 (0.02)	4 (0.03)	6 (0.06)	1 (0)	n.s.	n.s.	0.03 1.94 [1.06-3.56]	0.0001 3.22 [1.81- 5.75]	n.s.
A/G	32 (0.26)	18 (0.14)	29 (0.30)	52 (0.25)	n.s.	n.s.	0.04 6.73 [1.77-58.60]	0.0072 2.69 [1.38-5.23]	n.s.
G/G	86 (0.71)	105 (0.83)	63 (0.64)	155 (0.75)	n.s.	n.s.	0.001 0.40 [0.22-0.74]	0.001 0.35 [0.19-0.646]	n.s.

*****: ancestral allele; **n**: number of individuals; **%**: percentage; **CC**: cervical cancer patients; **CIN**: cervical intraepithelial neoplasia ; **Co**: control; **Cp**: comparison; **n.s.**: not significant; **&**: age and ethnicity corrected p-values.The codominant model was selected as the best inheritance model to analyze the association of the SNPs and the CC and high-grade CIN.

Supplementary Table 2. Clinical and demographic description of cervical cancer patients and high-grade CIN groups.

	Cervical Cancer n=99	High-grade CIN n=219
Sexually transmitted disease history n (%)	5 (0.05)	43 (19.63)
Age of first sexual intercourse average±SD	17.49 ± 3.62	16.16 ± 2.72
Number of pregnancies average±SD	3.44 ± 2.6	6.96 ± 1.96
Number of spontaneous abortions average±SD	1.68 ± 1.25	1.48 ± 0.76
Age at diagnosis average±SD	45.32 ± 13.16	18.39 ± 5.88
Deaths during the study n(%)	13 (0.13)	n.a.
Smoker history		
Active smoker n (%)	20 (0.20)	167 (76.25)
Former smoker n (%)	2 (0.02)	33 (15.07)
Type of cervical cancer		
Adenocarcinoma n (%)	14 (0.14)	n.ap.
Squamous cell carcinoma n (%)	85 (0.86)	n.ap.
FIGO classification*		
I		
I A1 n (%)	5 (0.05)	n.ap.
I A2 n (%)	3 (0.03)	n.ap.
I B1 n (%)	6 (0.06)	n.ap.
I B2 n (%)	5 (0.05)	n.ap.
II		
II A n (%)	3 (0.03)	n.ap.
II B n (%)	25 (0.25)	n.ap.
III		
III A n (%)	3 (0.03)	n.ap.
III B n (%)	14 (0.14)	n.ap.
III C n (%)	0	n.ap.
IV		
IV A n (%)	1 (0.01)	n.ap.
IV B n (%)	2 (0.02)	n.ap.
Treatment*		
Cold knife cone n (%)	55 (0.55)	0
Cervical cauterization n(%)	3 (0.03)	100 (45.66)
Hysterectomy n(%)	14 (0.14)	0

n.ap.: not applicable; **FIGO classification*:** 32 CC patients do not have FIGO classification available in the electronic medical record; **Treatment*:** 27 CC patients do not have treatment available in the electronic medical record; **n.a.:** not available



Supplementary figure 1. Electrophoretic pattern of PCR-SSP multiplex performed for the *MASP1* gene. For each sample, the four primer combinations were tested in PCR. The combination between the *MASP1*-rs13094773*G_For or *MASP1*-rs13094773*A_For primers and the *MASP1*-rs698105*T_Rev or *MASP1*-rs698105*C_Rev primers generates a *MASP1* fragment with 731bp. The combination of primers *MASP1*-rs3864098*C_For or *MASP1*-rs3864098*T_For and primers *MASP1*-rs1108450*A_Rev or *MASP1*-rs1108450*G_Rev generates a *MASP1* fragment with 607bp. simultaneously, a 500bp control fragment of the *FCN2*_Ex8 gene was amplified, as a PCR efficiency control. All PCRs a negative control (PCR mix without DNA: Ctr-) as a PCR precision control. Interpretation of genotypes: 1 = GC/GT (731bp) / TA/TA (607bp); 2 = GC/GT (731bp) / TA/TA (607bp); 3 = AC/AC (731bp) / TA/CC (607bp); C+ = AC/AT (731bp) / TA/CC (607bp).

4.2 ARTIGO 2- IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA MASP-3 NO TECIDO TUMORAL DE CC

A novel role for MASP-3 protein as a tumor suppressor?

Camila F. Oliveira-Toré¹, Helena Musetti B. S. Plácido¹, Angelica Beate Winter Boldt², Iara de Messias-Reason¹

Affiliations

¹ Postgraduate Program in Internal Medicine and Health sciences, Molecular Immunopathology Laboratory, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil.

² Postgraduate Program in Genetics, Department of Genetics, Human Molecular Genetics Laboratory, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

Abstract

Introduction: Cervical or cervical cancer (CC) is the fourth most common type of cancer in women, the evolution and establishment and this process of tumor development, there is a selective pressure on the tumor microenvironment, which allows cancer cells to evade the effects of the Complement System. Mannose-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) are proteins that play a crucial role in the Lectin Pathway (LP), the MASP-1 and MASP-3 are encoded by the *MASP1* gene by alternative splicing, and the mRNA MASP-1 and MASP-3 are highly expressed in uterine cervix, while the MASP-3 mRNA is highly expressed in the liver and cervix. The aim of this study was to evaluate the presence of MASP-3 in the tumor tissue of cervical cancer.

Methods: Tissue microarray immunohistochemistry (TMA) technique was performed on uterine cervix specimens provided by paraffin-embedded hysterectomy biopsy using anti-MASP-3 primary antibody.

Results: Tissue expression levels of MASP-3 from normal adjacent tissue compared to tumor tissue had significantly higher tissue expression in normal tissue and tumor tissue showed a higher expression of MASP-3 ($p=0.0013$).

Conclusion: Our findings suggest that MASP-3 is suppressed protein in cervical cancer tumor cells, and may be a new tumor marker protein. Furthermore, there is an isoform of MASP-3 located in the nucleus of normal uterine cervix cells, which we suggest is the isoform ENST392472.6, with a tumor suppressor role in cervical cancer

Keywords: mannose-binding lectin-associated serine proteases, cervical cancer, immunohistochemistry, complement system.

1. Introduction

Cervical or cervical cancer (CC) is characterized by persistent infection with human papillomavirus (HPV), which is the most common type of sexually transmitted virus, and has a high prevalence in young women (1–3). The inability to create an efficient immune response against HPV results in a persistent viral infection, which leads to the development of a chronic inflammation, as a consequence, the development of carcinomas (4,5).

The protease profile presented by tumors is relevant due to its ability to cleave the cellular matrix, facilitating the process of tumor invasion and metastasis (8). However, its role is not fully elucidated, due to the high number of protease genes that present different types of mutations in different types of cancers (8). Mannose-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) are proteases that has a crucial role in the Lectin Pathway (LP). LP is one of the three Complement System (SC) activation pathways, activated by pattern recognition receptors (PRRs) that are associated with MASPs, culminating in the formation of C3 convertase, an enzyme common to the three complement pathways (9–14).

Eight proteins are predicted resulting from alternative splicing of the pre-mRNA of the *MASP1* gene (14), this gene is highly pleiotropic, has 18 exons which result in 15 transcripts, of which two encode two serine proteases, MASP-1 and MASP-3 (11,15–17). The *MASP1* mRNA are highly expressed in female reproductive tissue, but their expression is suppressed in tumor tissues (8,20). Therefore, the objective of this article was to evaluate the presence of MASP-3 in the tumor tissue of cervical cancer.

2. Materials and Methods

The present study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Erasto Gaertner Hospital ethics and research committee, protocol number 4.712.123, and all volunteer participants signed the informed consent term. The authors confirm that all methods were carried out following relevant guidelines and regulations.

2.1 Clinical Characterization

This study included 17 paraffin-embedded hysterectomy biopsies from CC patients, provided by the Gynecology Outpatient Clinic of the Erasto Gaertner Hospital (Curitiba, Brazil). All patients were assisted by the public health systems. Sampling was for convenience, and paraffin blocks of biopsies were collected from 2017 to 2019. CC staging was performed using the FIGO system. A previous histological analysis of the paraffin blocks of each sample was performed by an expert pathologist, and two regions were marked: tumor and adjacent normal tissue, both from the same patient. Normal regions adjacent to tumor regions were considered as controls.

2.2 Histological and Immunohistochemistry Analysis

Tissue microarray immunohistochemistry (TMA) technique was performed on paraffin-embedded hysterectomy biopsy using anti-MASP-3 primary antibody (#HM2216, HyCult Biotech). The validation of the antibody and the optimal dilution was performed according to the manufacturer's instructions, using the recommended positive control (normal cervix human sample). The TMA was performed with 17 samples. All immunohistochemistry assay included both a negative control and positive control.

The immunostained slides were scanned and for each sample 50 satisfactory images were generated for analysis using a 40x objective. The positive control was used as a "mask", which contained adequate levels of immunoexpression and tissue MASP-3. The mask was superimposed on the sample images and, using the Image-Pro Plus software, the identified positive areas were transformed into positive immunoexpression areas per square micrometer (μm^2). The area in μm^2 obtained by this method was divided by the total area of the observed field, thus generating a percentage value for each image. Afterward, 30 high power fields per case (30 fields from each labeled region per patient) were selected and the biomarker was measured. The image analysis was performed and the percentage of MASP-3 tissue expression per HPF was obtained in each sample.

2.4 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.01. The results are expressed as the average, standard deviations, frequencies, or percentages. The Wilcoxon non-parametric test was performed to compare the quantitative variables between groups.

3. Results

3.1 Patients' Baseline and Pathological Features

Clinical characteristics and the pathological features of the CC patients are shown in **Table 1**. The CC patients have a mean age of 45.68 ± 12.27 years, 88.24% (15/17) are from the euro-Brazilians ethnic group, most of them have a history of previous CIN (58.82%) and of these 57.14% are CIN 2, and 88.23% have a family history of cancer. When we analyze smoking, we observe that 23.53% (4/17) of them are smokers, with a mean smoking time of 25 ± 22.07 years, a mean of 16 ± 20.65 cigarettes/day, and 41.17% (7/ 17) are ex-smokers. The average age at the first sexual intercourse was 16.56 ± 2.06 years, only five patient use condoms regularly (29.41%; 4/17), none of the patients have a history of sexually transmitted disease, and the number of abortions was 1.33 ± 0.57 (4/17).

Table 1. Baseline characteristics and pathological features of cervical cancer patients.

	CC n=17	SCC n=11	Adenocarcinoma n=6	p-value SCC vs Adeno
Age (average $\pm$ SD)	45.68 $\pm$ 12.27	46.88 $\pm$ 14.03	46.86 $\pm$ 11.09	0.6297
Year of diagnosis (average $\pm$ SD)	8.68 $\pm$ 7.00	8.69 $\pm$ 7.00	9.54 $\pm$ 7.54	0.9164
Previous CIN n (%)				
Yes	10 (58.82)	8 (72.72)	2 (33.33)	
No	7 (41.18)	3 (27.28)	4 (66.67)	
CIN 1	1 (7.14)	1 (9.09)	0	
CIN 2	8 (57.14)	3 (27.28)	2 (33.33)	
CIN 3	5 (35.72)	4 (36.36)	0	
FIGO staging n (%)*				

	IA1	5 (29.41)	5 (45.4)	0	
	IA2	3 (17.65)	3 (27.28)	0	
	IB1	3 (17.65)	2 (18.18)	1 (16.67)	
	IB2	1 (5.88)	1 (9.09)	0	
	IIB	3 (17.65)	0	3 (50.00)	
CKC previous n (%)					
	Yes	4 (23.53)	2 (18.18)	2 (33.33)	
	No	13 (76.47))	9 (81.82)	4 (66.67)	
Family history of cancer n (%)					
	Yes	15 (88.23)	10 (90.91)	5 (83.33)	
	No	2 (11.77)	1 (9.09)	1 (16.67)	
Number of pregnancies (average±SD; min-max)		3.35±1.93 1-8	3.36±1.93 1-8	3.42±2.02 1-4	0.9816

CC: cervical cancer; **SCC:** Squamous cell carcinoma; **CIN:** cervical intraepithelial neoplasia ; **FIGO:** International Federation of Gynecology and Obstetrics; **CKC:** cold knife cone; *: two patients with endometrioid adenocarcinoma without FIGO staging; **SD:** standard deviation.

3.1 Immunohistochemical Results

Tissue expression levels of MASP-3 from adjacent normal tissue were significantly higher compared to expression in tumor tissue ($p=0.0013$). The results are shown in the table 2 (**Figure 1**).

Table 2. Tissue expression levels of MASP-3 in tumor tissue and adjacent normal tissue of the uterine cervix.

	CC <i>N=17</i>	SCC <i>n=11</i>	Adenocarcinoma <i>n=6</i>	CC <i>Normal vs Tumor</i> <i>p-value [CI]</i>	SCC <i>Normal vs Tumor</i> <i>p-value [CI]</i>	Adenocarcinoma <i>Normal vs Tumor</i> <i>p-value [CI]</i>
MASP-3 expression level* (average±SD; min-max)						
Tumor tissue	8.19±2.75 3.22-13.86	8.10±1.96 3.22-9.69	8.84±4.56 4.05-13.86	0.0013 [3.35-11.42]	0.0064 [1.88-7.95]	0.0313 [2.37-8.31]
Adjacent normal tissue	15.03±9.45 5.25-39.27	14.58±6.51 8.37-29.05	20.00±12.00 6.91-39.28			

CC: cervical cancer; **SCC:** Squamous cell carcinoma; *: in percentage per high power fields (HPF); **CI:** confidential interval; **SD:** standard deviation.

The analysis of the adenocarcinoma and SCC patients showed a significant difference in the MASP-3 expression levels, they showed low expression in the tumor tissue ($p=0.0313$ and $p=0.0064$, respectively) (**Table 2**). However, no significant difference was found between MASP-3 expression in the adenocarcinoma and SCC ($p=0.2122$) (**Table 2**) (**Figure 1**). In the normal uterine cervix tissue there was a higher staining of MASP-3 in epithelial cells, besides that, MASP-3 is present in the cellular nucleus of some cells. (**Figure 2**)

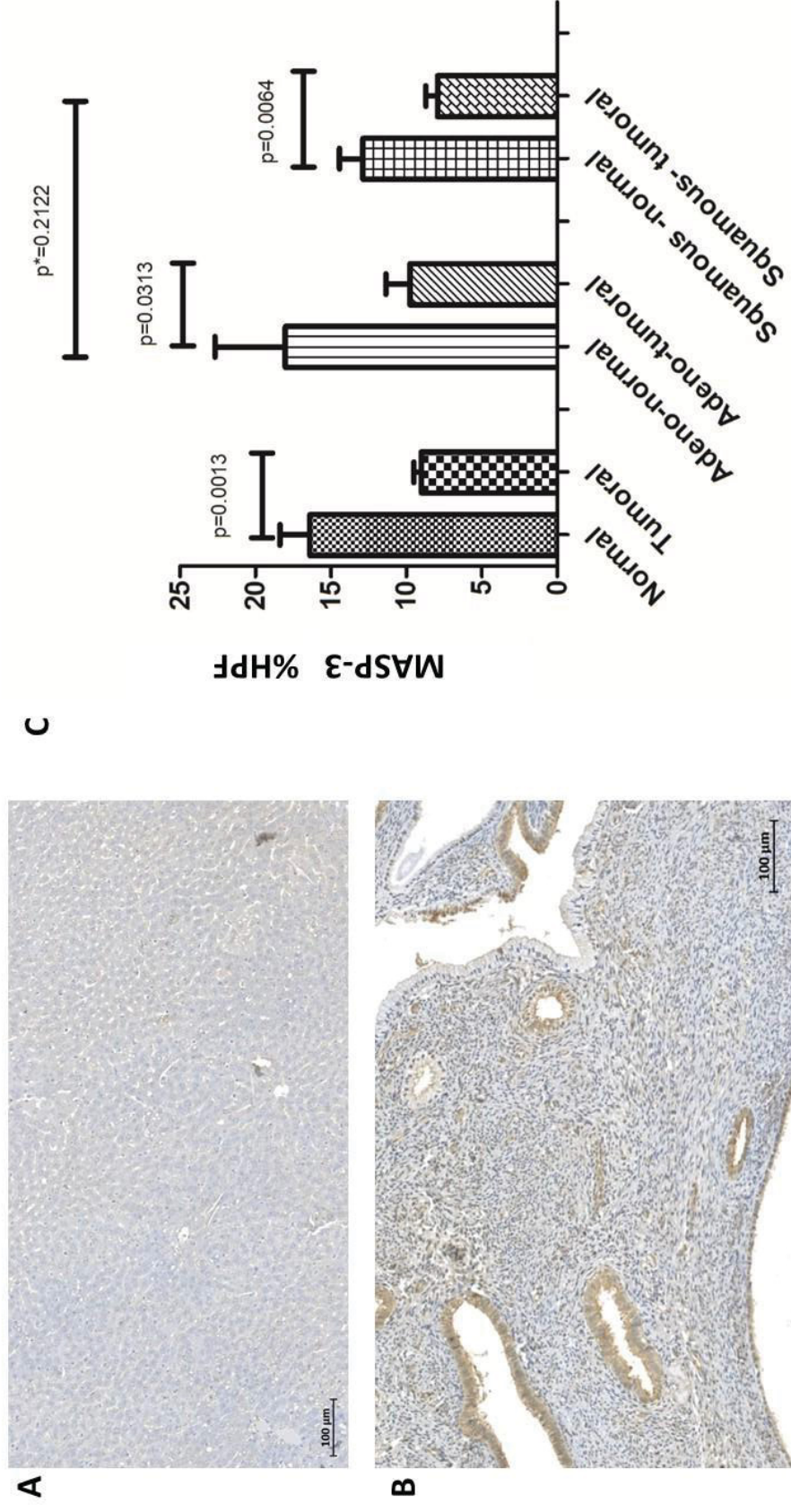


Figure 1. Differential expression of MASP-3 in normal uterine cervix and cervical tumor tissues. Normal uterine cervix tissue shows greater expression of MASP-3 (B) when compared to tumor tissue (A). Tumor tissue expresses MASP-3 at very low levels. (C) MASP-3 expression was also significant between normal vs tumor tissue of the different adenocarcinoma and squamous cell (when compared to normal vs tumor adjacent tissue for each histological type). However, there was no significant difference between the mean of expression

in adenocarcinoma vs squamous cell carcinoma. Adeno-normal: adenocarcinoma normal adjacent tissue; Adeno-tumoral: adenocarcinoma tumor tissue; Squamous-normal: squamous cell carcinoma normal adjacent tissue; Squamous-normal: squamous cell carcinoma: tumor tissue; HPF: high power fields.

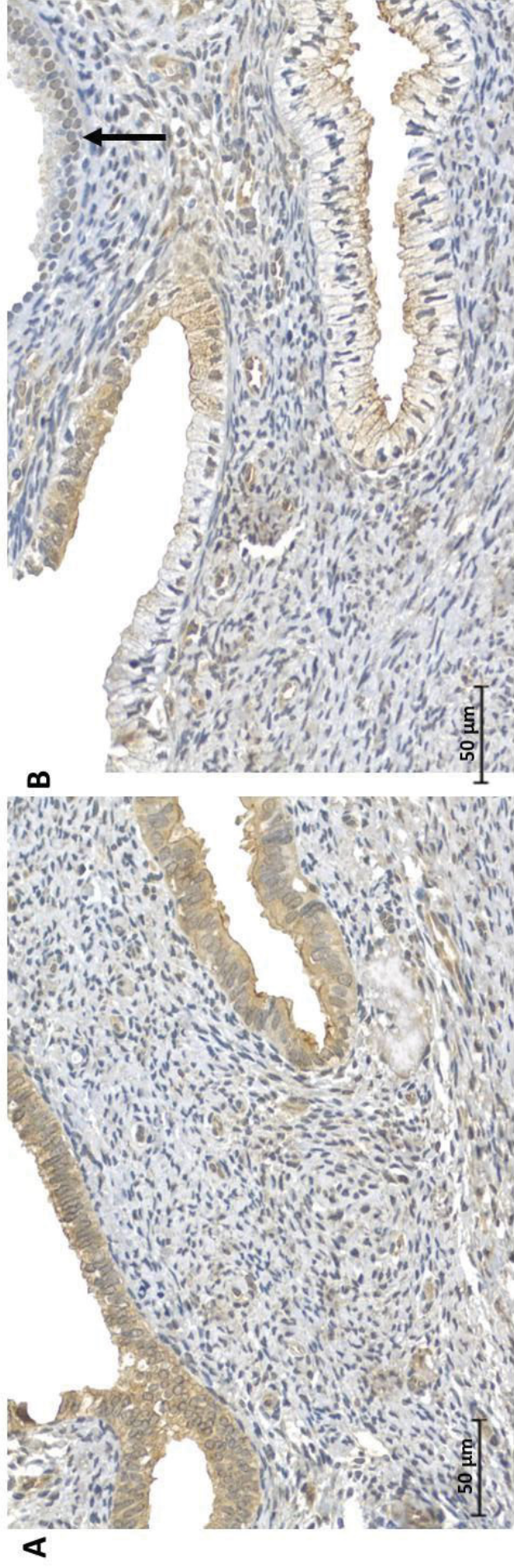


Figure 2. MASP-3 staining in normal uterine cervix tissue. **A:** Intense staining of MASP-3 in epithelial cells of the uterine cervix. **B:** intense staining in the epithelial cells, there is a positive reaction in the nucleus of some cells (black arrow).

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study evaluating MASP-3 protein quantification in CC tumors. Our findings show the suppression of MASP-3 in the CC tumor tissue, and contrary to what was expected MASP-3 was observed in the nucleus of normal cells of the uterine cervix.

MASP-3 has already been shown to be a tumor marker in colon cancer, with MASP-3 expression reduced by up to a thousand fold in tumor tissue (8). In animal models, the authors observed that MASP-3 expression in tumor tissue leads to a decrease in tumor size (8). Fraile et al. (8) suggest that MASP-3 is an important tumor marker in colon cancer. In the agreement, our findings show that in CC tumors the MASP-3 had a significantly lower expression, almost two times lower than the adjacent normal tissue. Interestingly, this low expression was not observed systemically in patients with CC. Maestri et al did not observe changes in MASP-3 serological levels, conversely, serum MASP-1 showed elevated levels in CC patients (7). Kong et al. report increased secretion of MASP-1 in CC tumor tissue when compared to adjacent normal tissue in HPV+ patients, but there was no significant association between high MASP-1 rates and patient survival (21). This increase in MASP-1 may occur as a LP immune response to viral infection, since this increase was significantly higher among HPV+ patients (21).

The MASP-3 protein is expressed by the *MASP1* gene, which also encodes the MASP-1 and MASP-3 isoforms by alternative splicing (11,14–17). The *MASP1* gene has already been found upregulated in lung cancer and glioma (20–24). Kuraya et al. observed high levels of MASP-1 and MASP-3 mRNAs in glioma cell lines, in addition, the culture supernatants showed a significant increase in the secretion of MASP-1 and MASP-3 (24). High mRNA expression of other CS components was also detected, such as C1r, C1s, C2, C3, C4, C5 and C6, leading to the hypothesis that SC is widely activated in glioma cells (24). In databases, the only tumor tissue that shows high expression of MASP1 mRNA is glioma (20), other tumor types show suppression of MASP1 mRNA (20).

Our findings of MASP-3 in the nucleus of uterine cervix cells indicate that there is an isoform of *MASP1* gene present in the cell nucleus, not corresponding to the MASP-1 (ENST337774.10) or MASP-3 (ENST296280.1) isoforms which are serum proteins. There is an isoform of MASP-3 (ENST392472.6) lacking exon 2, which lacks the signal peptide and the CUB1 domain, leading a protein retained in the cell (20, Ensembl). Our

data suggest that the MASP-3 observed in the nucleus may be this isoform not yet functionally characterized. This isoform is highly expressed in the female reproductive system (18,19 and 20), but was observed in this work to be suppressed in the CC tumor tissue. The intranuclear isoform of MASP-3 may have an important epigenetic role as a tumor suppressor due to its interaction with the histone variant H2AFX, which is part of a chromatin regulatory complex (25-28). However, future investigations are needed to elucidate the biological mechanism that encompasses this isoform in cancer.

Since the biological role of classical MASP-3 (ENST296280.1) has not yet been fully elucidated, we cannot rule out that MASP-3 may also play an important role in the tumor suppressor mechanism. MASP-3 may act on tumor cells through the cleavage of insulin-like growth factor 5 (IGFBP-5), modulating the actions of growth factors in profile reaction, differentiation and cell motility (29).

In conclusion, MASP-3 is significantly suppressed in cervical cancer tumor tissue, and may be a new tumor marker protein. Furthermore, there is an isoform of MASP-3 located in the nucleus of normal uterine cervix cells, which we suggest is the isoform ENST392472.6, with a tumor suppressor role in cervical cancer.

5. Conflict of Interest

All authors state that potential conflicts do not exist.

6. Acknowledgement

We thank Dr Jens Christian Jensenius of Aarhus University for the anti-MASP-3, the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP - Finance Code 001) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support and for the scholarships provided to CFO-T (40001016012P1) and HMBSP (134403/2020-7). To the Postgraduate Program in Internal Medicine and Health Sciences – Federal University of Paraná and to the Laboratory of Molecular Immunopathology.

7. Financial support

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior 001).

1. Sellors JW, Sankaranarayanan R. Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia : A Beginners ' Manual. **World Health Organization**. 2003. Available from: <https://screening.iarc.fr/colpo.php>.
2. INCA. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Ministério da Saúde. **INCA**. 2016;33:81–87. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/rastreamento_cancer_colo_uterio.pdf.
3. WHO. Cervical cancer. **World Health Organization**. 2019. Available from: <https://www.who.int/health-topics/cervical-cancer>.
4. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, *et al*. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine**. 2012;30:55–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>.
5. Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki A barbara, Gillison ML, Doorbar J, *et al*. Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases &. **Vaccine**. 2013;31:H1–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.003>.
6. Costa F, Berti B, Paula A, Pereira L, Cesar G, Cebinelli M, *et al*. Cytokine & Growth Factor Reviews The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. **Cytokine Growth Factor Rev**. 2017;34:1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.03.002>.
7. Maestri CA, Nisihara R, Mendes HW, Mitchell DA. MASP-1 and MASP-2 Serum Levels Are Associated With Worse Prognostic in Cervical Cancer Progression. **Front Immunol**. 2018;9:1–5. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02742>.
8. Fraile JM, Ordóñez GR, Quirós PM, Astudillo A, Galván A, Colomer D, *et al*. Identification of novel tumor suppressor degradome profiling of colorectal carcinomas proteases by degradome profiling of colorectal carcinomas. **Oncotarget**. 2013;4(11):1999–1932. Available from: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1303>.
9. Degn S, Thiel S, Jensenius JC. New perspectives on mannan-binding lectin-mediated complement activation. **Immunobiology**. 2007;212:301–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.12.004>.
10. Degn SE, Jensen L, Gál P, Dobó J, Holmvas SH, Jensenius JC, *et al*. Biological variations of MASP-3 and MASP44 , two splice products of the MASP1 gene involved in regulation of the complement system. **J Immunol Methods**. 2010;361(1–2):37–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2010.07.006>.
11. Degn SE, Jensenius JC, Thiel S. Disease-Causing Mutations in Genes of the Complement System. **Am J Hum Genet**. 2011;88(6):689–705. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.05.011>.
12. Thiel S, Jensen L, Degn SE. Mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1), a serine protease associated with humoral pattern-recognition molecules: normal and acute-phase levels in serum and stoichiometry of lectin pathway components. **Clin Exp Immunol**. 2012;1:38–48. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04584.x>.

13. Dobó J, Pál G, Cervenak L, Gál P. The emerging roles of mannose- binding lectin-associated serine proteases (MASPs) in the lectin pathway of complement and beyond. **Immunol Rev.** 2016;98–111. Available from: <https://doi.org/10.1111/imr.12460>.
14. Boldt ABW, Boschmann SE, Catarino SJ, Andrade FA, Messias-REason I. Encyclopedia of Signaling Molecules. **Springer.** 2018;2972–2989. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4>.
15. Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita T, Willis AC, Christensen T, *et al.* MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. **Immunol.** 2001;15(1):127–135. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00161-3).
16. Degn SE, Hansen AG, Steffensen R, Jacobsen C, Jensenius JC, Thiel S, *et al.* MAp44, a Human Protein Associated with Pattern Recognition Molecules of the Complement System and Regulating the Lectin Pathway of Complement Activation. **J Immunol.** 2009;183:7371–7378. Available from: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902388>.
17. Skjoedt MO, Hummelshoj T, Palarasah Y, Honore C, Koch C, Skjodt K, *et al.* A Novel Mannose-binding Lectin/Ficolin-associated Protein Is Highly Expressed in Heart and Skeletal Muscle Tissues and Inhibits Complement Activation*. **J Biol Chem.** 2010;285(11):8234–8243. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065805>.
18. Ensembl Release 108. **Ensembl Genomes.** 2022. Available from: <http://www.ensembl.org/>.
19. Kersey PJ, Allen JE, Allot A, Barba M, Boddur S, Bolt BJ, *et al.* Ensembl Genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. **Nucleic Acids Res.** 2018;46:802–808. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1011>.
20. The Human Protein Atlas. Knut & Alice Wallenberg foundation. **Human Protein Atlas.** 2022. Available from: <https://www.proteinatlas.org>.
21. Kong L, Wang J, Cheng J, Zang C, Chen F, Wang W, *et al.* Comprehensive Identification of the Human Secretome as Potential Indicators in Treatment Outcome of HPV-Positive and -Negative Cervical Cancer Patients. **Gynecol Obstet Invest.** 2020;85(5):405–415. Available from: <https://doi.org/10.1159/000510713>.
22. Genotype-Tissue Expression (GTEx) Portal. Broad Inst MIT & Harvard. **GTEx.** Available from: <https://www.gtexportal.org/home/>.
23. Kang JU, Koo SH, Kwon KC, Park JW, Kim JM. Identification of novel candidate target genes, including EPHB3, MASP1 and SST at 3q26.2-q29 in squamous cell carcinoma of the lung. **BMC Cancer.** 2009;9:1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-237>.
24. Kuraya M, Matsushita M, Endo Y, Thiel S, Fujita T. Expression of H-colin/Hakata antigen, mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and MASP-3 by human glioma cell line T98G. **Int Immunol.** 2003;15:109–117. Available from: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxg008>.
25. InnateDB: systems biology of the innate immune response. **InnateDB.** 2022. Available from: <https://www.innatedb.com>.
26. Lynn DJ, Winsor GL, Chan C, Richard N, Laird MR, Barsky A, *et al.* InnateDB: facilitating systems-level analyses of the mammalian innate immune response. **Mol Syst Biol.** 2008;4:218. Available from: <https://doi.org/10.1038/msb.2008.55>.
27. Zhou B bing S, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature.** 2000;408:433–439. Available from: <https://doi.org/10.1038/35044005>.
28. Rouse J, Jackson SP, Rouse J, Jackson SP. Interfaces Between the Detection , Signaling, and Repair of DNA Damage. **Science.** 2002;297(5581):547–551. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1074740>.

- 29 CORTESIO, C. L.; JIANG, W. Mannan-binding lectin-associated serine protease 3 cleaves synthetic peptides and insulin-like growth factor-binding protein 5. **Archiv Biochem Biophys**, v. 449, p. 164–170, 2006. DOI:10.1016/j.abb.2006.02.006.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação dos polimorfismos do gene *MASP1* em mulheres com câncer cervical, neoplasias intraepiteliais cervical de alto grau e controles, realizada neste estudo controlado, conduziu as seguintes conclusões:

- A padronização da reação de uma reação de PCR-SSP multiplex para os SNPs *rs13094773*, *rs698105*, *rs1108450* e o *rs3864098* localizados em regiões intrônicas e regulatórias de *MASP1* foi realizada, e a técnica nos permite uma genotipagem confiável e de baixo custo;
- As frequências alélicas e genóticas encontram-se conforme o estimado em bancos de dados genéticos, Ensembl databaset e GTEx Portal, além disso as distribuições genóticas e haplotípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg;
- Como fatores genéticos de suscetibilidade para o CC e NIC de alto grau temos os haplótipos de *MASP1_intron1_intron2_exon12*: *GTG_CCC_CCA* e *GTG_CCC_CCG*;
- Os haplótipos de *MASP1_intron1_intron2_exon12* *GCG_CCC_CCA* e *GCG_CCC_CCG* foram associadas à progressão da NIC de alto grau para o CC;
- O haplótipo *intron1_GTG* aumenta significativamente as chances de uma mulher saudável desenvolver CC e NIC de alto grau;
- Os SNPs do exon 12 podem estar envolvidos na suscetibilidade ao CC, a NIC de alto grau e a progressão destas lesões ao CC observadas neste trabalho.
- Os haplótipos com associação positiva, *exon12_CCC* e *_CCA* associados a susceptibilidade ao CC, NIC de alto grau e a progressão destas lesões ao CC podem desempenhar papéis importantes na diminuição dos níveis de expressão do *mRNA* da *MASP-3*.

- As combinações associadas positivamente com CC *rs1109452_rs850314*CG* e *rs1109452_rs850314*CA* do exon 12 são regiões gênicas alvo de miRNAs os quais podem influenciar na redução das taxas de tradução de MASP-3
- Os dados da imunohistoquímica sugere papel de supressor tumoral para a MASP-3 no desenvolvimento do CC. O tecido tumoral de CC apresenta uma expressão média de MASP-3 quase duas vezes menor que o tecido normal adjacente;
- Foi também observado a expressão da MASP-3 no núcleo de células normais da cérvix uterina. Sugerimos que esta proteína MASP-3 observadas seja uma nova isoforma de MASP-3, a qual chamamos de MASP-3 intranuclear ou intracelular. Em bancos de dados há uma isoforma de MASP-3 sem o exon 2 (ENST00000392472.6) que não possui o peptídeo sinal e nem o domínio CUB1, inferimos que esta seja a MASP-3 observada neste trabalho;
- Nossos dados genéticos corroboram com nossos achados na análise de TMA. Sendo assim, os mecanismos celulares afetados pelos haplótipos das regiões reguladoras de *MASP1* e do *exon 12* podem ser considerados possíveis mecanismos para compreendermos a supressão da expressão de MASP-3 no tecido tumoral de CC.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como perspectivas futuras para a tese, experimentos de PCR tempo real foram planejadas com o objetivo de investigar a expressão dos mRNAs de MASP-1, MASP-3 e MASP-3 intranuclear em tecidos de biopsias de câncer cervical. As coletas de biopsias já foram iniciadas em 2020, mas devido a pandemia do Coronavírus as coletas foram interrompidas. Este experimento auxiliará na confirmação da hipótese levantada nesta tese.

A identificação e caracterização da nova MASP-3, a intranuclear, foi pensada e planejada em parceria com a Universidade de Aarhus na Dinamarca sob orientação do Dr. Sttefen Thiel, pesquisador da área que indentificou a isoforma MASP-2, o qual já forneceu o aceite para a realização dos experimentos em seu laboratório.

6 REFERÊNCIAS

AIDÉ, S. *et al.* Neoplasia intraepitelial cervical. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 21, n. 4, p. 166–170, 2009. Disponível em: <https://www.bjstd.org/revista/article/view/1000/895>.

AINA, O. E. *et al.* Classification of Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) using fine-tuned Convolutional Neural Networks. **Intell-Based Med**, v. 5, p. 100031, 2021. DOI:10.1016/j.ibmed.2021.100031.

ALEMANY, L. *et al.* Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **Lancet Oncol**, v. 11, p. 1048–1056, 2010. DOI:10.1016/S1470-2045(10)70230-8.

ALI, Y. M. *et al.* The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 7, p. 46, 2012. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002793.

AMERICAN CANCER SOCIETY. What Is Cervical Cancer? **Am Cancer Soc**. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/about/what-is-cervical-cancer.html>. Acesso em: outubro de 2022.

AMMITZBØLL, C. G. *et al.* Polymorphisms in the MASP1 gene are associated with serum levels of MASP-1, MASP-3, and MASP44. **Plos One**, v. 2, n. 8, 2 setembro, 2013.

ANDRADE, F. A. *et al.* Serine Proteases in the Lectin Pathway of the Complement System. **Springer Nat Singapore**, p. 397-420, 2017. DOI:10.1007/978-981-10-2513-6_18.

ATIK, T. *et al.* Novel MASP1 mutations are associated with an expanded phenotype in 3MC1 syndrome. **Orphanet J Rare Dis**, v. 10, n. 1, 2015. DOI: 10.1186/s13023-015-0345-3.

ÁYEN, Á.; MARTÍNEZ, Y. J.; BOULAIZ, H. Targeted gene delivery therapies for cervical cancer. **Cancers**, v. 12, n. 5, p. 1301, 2020. DOI: 10.3390/cancers12051301.

BALASUBRAMANIAM, S. D. *et al.* Key molecular events in cervical cancer development. **Mol Events Cervical Cancer Dev**, v.55, n.7, p.384, 2019. DOI:10.3390/medicina55070384.

BANDYOPADHYAY, S. *et al.* Adjunctive human papillomavirus DNA testing is a useful option in some clinical settings for disease risk assessment and triage of females with ASC-H Papanicolaou test results. **Arch Pathol & Labo Med**, v. 132, n. 2, p. 1874–1881, 2008. DOI: 10.5858/132.12.1874.

BASU, P. *et al.* Efficacy and safety of human papillomavirus vaccine for primary prevention of cervical cancer: A review of evidence from phase III trials and national programs. **South Asian J Cancer**, v. 2, n. 4, p. 187–192, 2013. DOI: 10.4103/2278-330X.119877.

BELTRAME, M. H. *et al.* The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. **Front Pediatr**, v. 2, p. 1–14, 2015. DOI:10.3389/fped.2014.00148.

BOLDT, A. B. W. *et al.* Encyclopedia of Signaling Molecules. **Springer**, p. 2972–2989, 2018. DOI:10.1007/978-3-319-67199-4.

BOSCH, F. X. *et al.* Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases. **Vaccine**, v. 31, p. H1–H31, 2013. DOI:10.1016/j.vaccine.2013.10.003.

BRAGANÇA, J. F. *et al.* Expression of p16 INK4a and cervical infection with high-risk human papillomaviruses are not related to p53 activity in cervical intraepithelial neoplasia. **Int J Gynecol Cancer**, v. 18, n. 5, p. 1060–1064, 2008. DOI:10.1111/j.1525-1438.2007.01148.x.

BULLA, R. *et al.* C1q acts in the tumour microenvironment as a cancer-promoting factor independently of complement activation. **Nat Commun**, v. 7, p.10346, 2016. DOI: 10.1038/ncomms10346.

BUMILLER-BINI, V. *et al.* Sparking fire under the skin? Answers from the association of complement genes with pemphigus foliaceus. **Front Immunol**, v. 9, p.695, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00695.

BURK, R. D. *et al.* Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. **Nat**, v. 543, n. 7645, p. 378–384, 2017. DOI:10.1038/nature21386.

Cancer. **World Health Organization**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: maio de 2022.

CARNS, B.; FADARE, O. Papanicolaou Test in the Detection of High-Grade Cervical Lesions: A Re-evaluation Based on Cytohistologic Non-correlation Rates in 356 Concurrently Obtained Samples. **Int J Clin Exp Pathol**. Disponível em: www.ijcep.com/IJCEP708013. Acesso em: outubro de 2022.

CAUSIN, R. L. *et al.* A systematic review of micrnas involved in cervical cancer progression. **Cells**, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2021. DOI:10.3390/cells10030668.

CAVALCANTI, E. O. *et al.* MASP1 Gene Polymorphism and MASP-3 Serum Levels in Patients with Chronic Chagas Disease. **Immunol Invest**, v. 51, n. 7, p. 2108–2121, 2022. DOI:10.1080/08820139.2022.2110503

CLIFFORD, G. M. *et al.* Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: A meta-analysis. **Br J Cancer**, v. 88, n. 1, p. 63–69, 2003. DOI:10.1038/sj.bjc.6600688.

COLLINS, S. *et al.* Cigarette smoking is an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia in young women: A longitudinal study. **Eur J Cancer**, v. 46, n. 2, p. 405–411, 2010. DOI:10.1016/j.ejca.2009.09.015.

CORTESIO, C. L.; JIANG, W. Mannan-binding lectin-associated serine protease 3 cleaves synthetic peptides and insulin-like growth factor-binding protein 5. **Archiv Biochem Biophys**, v. 449, p. 164–170, 2006. DOI:10.1016/j.abb.2006.02.006.

COSTA, F. *et al.* The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 34, p. 1–13, 2017. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2017.03.002

CROSBIE, E. J. *et al.* Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, v. 382, n. 9895, p. 889–899, 2013. DOI:10.1016/S0140-6736(13)60022-7.

DAHL, M. R. *et al.* MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. **Immunity**, v. 15, n. 1, p. 127–135, 2001. DOI:10.1016/s1074-7613(01)00161-3.

DEGN, S. E. *et al.* MAp44, a Human Protein Associated with Pattern Recognition Molecules of the Complement System and Regulating the Lectin Pathway of Complement Activation. **J Immunol**, v. 183, p. 7371–7378, 2009. DOI: 10.4049/jimmunol.0902388.

DEGN, S. E. *et al.* Biological variations of MASP-3 and MAp44, two splice products of the MASP1 gene involved in regulation of the complement system. **J Immunol Methods**, v. 361, n. 1–2, p. 37–50, 2010. DOI:10.1016/j.jim.2010.07.006.

DEGN, S. E. *et al.* Co-Complexes of MASP-1 and MASP-2 Associated with the Soluble Pattern-Recognition Molecules Drive Lectin Pathway Activation in a Manner Inhibitable is current as by MAp44. **J Immunol**, v. 191, n. 3, p. 1334-1345, 2013. DOI:10.4049/jimmunol.1300780.

DEGN, S. E.; JENSENIUS, J. C.; THIEL, S. Disease-Causing Mutations in Genes of the Complement System. **Ame J Hum Genet**, v. 88, n. 6, p. 689–705, 2011. DOI:10.1016/j.ajhg.2011.05.011

DEGN, S. E.; JENSENIUS, J. C.; THIEL, S. The Pro-Factor D Cleaving Activity of MASP-1/-3 Is Not Required for Alternative Pathway Function. **J Immunol**, v. 192, n. 12, p. 5447–5448, 2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1400777.

DEGN, S.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. New perspectives on mannan-binding lectin-mediated complement activation. **Immunobiology**, v. 212, n.4-5, p. 301–311, 2007. DOI: DOI: 10.1016/j.imbio.2006.12.004

DOBÓ, J. *et al.* MASP-1, a Promiscuous Complement Protease: Structure of Its Catalytic Region Reveals the Basis of Its Broad Specificity. **J Immunol**, v. 183, n. 2, p. 1207–1214, 2009. DOI:10.4049/jimmunol.0901141.

DOBÓ, J. *et al.* Multiple roles of complement MASP-1 at the interface of innate immune response and coagulation. **Mol Immunol**, v. 61, n. 2, p. 69–78, 2014. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.05.013.

DOBÓ, J. *et al.* The emerging roles of mannose-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) in the lectin pathway of complement and beyond. **Immunol Rev**, v. 274, p. 98–111, 2016a. DOI: 10.1111/imr.12460.

DOBÓ, J. *et al.* MASP-3 is the exclusive pro-factor D activator in resting blood: The lectin and the alternative complement pathways are fundamentally linked. **Sci Rep**, v. 6, 2016b. DOI:10.1038/srep31877.

DOBÓ, J.; KOCSIS, A.; GÁL, P. Be on target: Strategies of targeting alternative and lectin pathway components in complement-mediated diseases. **Front Immunol**, v. 9, 2018. DOI:10.3389/fimmu.2018.01851.

DOORBAR, J. *et al.* The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, p. F55–F70, 2012. DOI:10.1016/j.vaccine.2012.06.083.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Res**, v. 20, n. 1, p. 34–50, 2010. DOI:10.1038/cr.2009.139.

ENDO, Y.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. New insights into the role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. **Int Rev Cell Mol Biol**, v. 316, p. 49-110, 2015. DOI:10.1016/bs.ircmb.2015.01.003.

ENSEMBL. **Ensembl Genomes**. 2022. Disponível em: <<http://www.ensembl.org/>> Acesso em: outubro de 2022.

ERIKSSON, O. *et al.* Mannose-Binding Lectin is Associated with Thrombosis and Coagulopathy in Critically Ill COVID-19 Patients. **Thrombosis and Haemostasis**, 2020.

F. QUAIL, D.; J. TAYLOR, M.; POSTOVIT, L.-M. Microenvironmental Regulation of Cancer Stem Cell Phenotypes. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, n. 3, p. 197–216, 2012.

FELIX, J. C.; WRIGHT, T. C.; AMEZCUA, C. A. Cervix. **Modern Surgical Pathology**, v. 2, p. 1263–1294, 2009.

FONSECA, F. V. O PAPEL DO IMUNOMARCADOR P16(INK4A) NO MANEJO DA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL DE ALTO GRAU, SEU RISCO DE RECORRÊNCIA E A ASSOCIAÇÃO COM A TIPAGEM DE HPV. v. 16, 2016.

FONSECA, F. V. *et al.* The role of p16 (INK4a) and p53 immunostaining in predicting recurrence of HG-CIN after conization treatment. **Rev Col Bras Cir**, v. 43, n. 1, p. 35–41, 2016.

FRAILE, J. M. *et al.* Identification of novel tumor suppressor degradome profiling of colorectal carcinomas proteases by ABSTRACT : v. 4, n. 11, 2013.

FRANCESCHI, S.; HERRERO, R.; CLIFFORD, G. M. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. **Int J Cancer** , v. 119, n. 11, p. 2677–2684, 2006.

FRAZER, I. Correlating immunity with protection for HPV infection. **Int J Infect Dis**. v.2, p. 10-16, novembro 2007.

FRUMOVITZ, M. *et al.* Quality of life and sexual functioning in cervical cancer survivors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 30, p. 7428–7436, 2005.

FUJITA, T. Evolution of the lectin - Complement pathway and its role in innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 5, p. 346–353, 2002.

FUJITA, T.; ENDO, Y.; NONAKA, M. Primitive complement system - Recognition and activation. **Molecular Immunology**, v. 41, n. 2–3, p. 103–111, 2004.

FUJITA, T.; MATSUSHITA, M.; ENDO, Y. The lectin-complement pathway - Its role in innate immunity and evolution. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 185–202, 2004.

GAJEK, G.; ŚWIERZKO, A. S.; CEDZYŃSKI, M. Association of polymorphisms of MASP1/3, COLEC10, and COLEC11 genes with 3MC syndrome. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 1–14, 2020.

GÁL, P. *et al.* Early complement proteases: C1r, C1s and MASPs. A structural insight into activation and functions. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 14, p. 2745–2752, 2009.

GOODWIN, E. C. *et al.* **Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org>.

GORELIK, A. *et al.* Developmental activities of the complement pathway in migrating neurons. **Nature Communications**, v. 8, 2017.

GTEX PORTAL. Genotype-Tissue Expression Project. 2022. Disponível em: <<https://www.gtexportal.org/home/>>. Acesso em: outubro de 2022.

GULLA, K. C. *et al.* Activation of mannan-binding lectin-associated serine proteases leads to generation of a fibrin clot. **Immunology**, v. 129, n. 4, p. 482–495, abr. 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of preCell.** [s.l: s.n.].

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation.** **Cell**, 4 mar. 2011.

HESS, K. *et al.* Effects of MASP-1 of the complement system on activation of coagulation factors and plasma clot formation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 20 abr. 2012.

HOLL, K. *et al.* Human papillomavirus prevalence and type-distribution in cervical glandular neoplasias: Results from a European multinational epidemiological study. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 12, p. 2858–2868, 15 dez. 2015.

IKEDA, K. *et al.* Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 16, p. 7451–7454, 5 jun. 1987.

INCA. Câncer do colo do útero. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 46, n. 4, p. 351–354, 2000.

INCA. Monitoramento das ações de controle dos cânceres do colo do útero e de mama. . **Informativo Detecção Precoce**, 2014.

INCA. **Diretrizes Brasileiras para o rastreamento Do Câncer Do Colo Do Útero**. 2016 v. XXXIII

INCA. **Incidência de Câncer no Brasil**. DADOS E NÚMEROS SOBRE CÂNCER DO COLO DO ÚTERO Relatório Anual 2022. Nov. 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document/dados_e_numero_s_colo_22novembro2022_0.pdf>

INCA. **Detecção precoce do câncer**. 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/deteccao-precoce-do-cancer.pdf>>.

INCA. **Conceito e Magnitude: entenda o conceito do câncer do colo do útero e sua magnitude no Brasil**.

IARC. **International Agency for research on Cancer**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype>>.

IARC. **International Agency for research on Cancer**. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?sexes=2&single_unit=50000&cancers=23>.

JANI, P. K. *et al.* MASP-1 induces a unique cytokine pattern in endothelial cells: A novel link between complement system and neutrophil granulocytes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 29 jan. 2014.

JENKINS, D. *et al.* Molecular and pathological basis of HPV-negative cervical adenocarcinoma seen in a global study. **International Journal of Cancer**, v. 147, n. 9, p. 2526–2536, 1 nov. 2020.

JENNY, L. *et al.* Plasma levels of mannan-binding lectin-associated serine proteases MASP-1 and MASP-2 are elevated in type 1 diabetes and correlate with glycaemic control. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 180, n. 2, p. 227–232, 1 maio 2015.

JENNY, L. *et al.* MASP-1 of the complement system enhances clot formation in a microvascular whole blood flow model. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2018.

Jl, X. *et al.* **Ancient origin of the complement lectin pathway revealed by molecular cloning of mannan binding protein-associated serine protease from a urochordate, the Japanese ascidian, Halocynthia roretzi** *Immunology*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.pnas.org>>.

KALLIALA, I. *et al.* **Incidence and mortality from cervical cancer and other malignancies after treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis of the literature**. **Annals of Oncology** Elsevier Ltd, , 1 fev. 2020.

KANG, J. U. *et al.* Identification of novel candidate target genes, including EPHB3, MASP1 and SST at 3q26.2-q29 in squamous cell carcinoma of the lung. **BMC Cancer**, v. 9, p. 1–15, 2009.

KERSEY, P. J. *et al.* Ensembl Genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. v. 46, n. October 2017, p. 802–808, 2018.

KIMURA, A.; SAKAGUCHI, E.; NONAKA, M. Multi-component complement system of Cnidaria: C3, Bf, and MASP genes expressed in the endodermal tissues of a sea anemone, *Nematostella vectensis*. **Immunobiology**, v. 214, n. 3, p. 165–178, mar. 2009.

KONG, L. *et al.* Comprehensive Identification of the Human Secretome as Potential Indicators in Treatment Outcome of HPV-Positive and -Negative Cervical Cancer Patients. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 85, n. 5, p. 405–415, 2020.

KRARUP, A. *et al.* Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. **PLoS ONE**, v. 2, n. 7, 18 jul. 2007.

KRARUP, A. *et al.* The action of MBL-associated serine protease 1 (MASP1) on factor XIII and fibrinogen. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1784, n. 9, p. 1294–1300, 2008.

KURAYA, M *et al.* Expression of H-2colin/Hakata antigen, mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and MASP-3 by human glioma cell line T98G. v. 15(1), n.109-17,janeiro 2003.

LUNDBERG, G. D. **The 1988 Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytological Diagnoses National Cancer Institute Workshop THE DEATH rate from cervical cancer.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/>>.

LYNN, D. J. *et al.* InnateDB : facilitating systems-level analyses of the mammalian innate immune response. n. 218, 2008.

MAESTRI, C. A. *et al.* MASP-1 and MASP-2 Serum Levels Are Associated With Worse Prognostic in Cervical Cancer Progression. v. 9, n. November, p. 1–5, 2018.

MARTINEZ JR, F. **ASC-US vs. ASC-H? What is the difference?**

MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; FUJITA, T. Structural and functional overview of the lectin complement pathway: Its molecular basis and physiological implication. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 61, n. 4, p. 273–283, 2013.

MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. **Activation of the Classical Complement Pathway by Marmose-binding Protein in Association with a Novel C1s-like Serine Protease.** [s.l.: s.n.].

MCGRAW, S. L.; FERRANTE, J. M. Update on prevention and screening of cervical cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 4, p. 744–752, 10 out. 2014.

MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E.; MEYERS, J.; MUNGER, K. **Cancer associated human papillomaviruses.** **Current Opinion in Virology** Elsevier B.V., , 2012

MEGYERI, M. *et al.* Quantitative characterization of the activation steps of mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases (MASPs) points to the central role of MASP-1 in the initiation of the complement lectin pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 13, p. 8922–8934, 29 mar. 2013.

MENDES, H. C. W. **POLIMORFISMOS DO GENE MASP1, CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MASP-1, MASP-3 E MASP44 E SUSCETIBILIDADE À HANSENÍASE.** [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2015.

MENDES, H. W. *et al.* Adding masp1 to the lectin pathway—leprosy association puzzle: Hints from gene polymorphisms and protein levels. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 4, p. 1–20, 1 abr. 2020.

MERLE, N. S. *et al.* **Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation.** **Frontiers in Immunology** Frontiers Research Foundation, , 2015a.

MERLE, N. S. *et al.* **Complement system part II: Role in immunity.** **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 2015b.

MESRI, E. A.; FEITELSON, M. A.; MUNGER, K. **Human viral oncogenesis: A cancer hallmarks analysis.** **Cell Host and Microbe** Cell Press, , 12 mar. 2014.

MØLLER-KRISTENSEN, M. *et al.* Levels of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 in healthy individuals. **Journal of Immunological Methods**, v. 282, n. 1–2, p. 159–167, 2003.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. **Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. Nature Reviews Cancer**, ago. 2010.

NONAKA, M. Evolution of the complement system. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 80, p. 31–43, 2014.

NONAKA, M.; MIYAZAWA, S. Evolution of the initiating enzymes of the complement system. **Genome Biology**, v. 3, n. 1, 2001.

OLAWAIYE, A. B. *et al.* FIGO staging for carcinoma of the vulva: 2021 revision. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 155, n. 1, p. 43–47, 1 out. 2021.

OROSZLÁN, G. *et al.* MASP-1 and MASP-2 Do Not Activate Pro–Factor D in Resting Human Blood, whereas MASP-3 Is a Potential Activator: Kinetic Analysis Involving Specific MASP-1 and MASP-2 Inhibitors. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 2, p. 857–865, 15 jan. 2016.

OSTÖR, A. G. *et al.* Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. **Int J Gynecol Pathol**, v. 12, n.2, p. 186–192, abril de 1993.

PAPANICOLAOU, G. N. Atlas of exfoliative cytology. **Cambridge: Harvard University Press**, 1954.

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

PIROG, E. C. *et al.* HPV prevalence and genotypes in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma, a worldwide analysis of 760 cases. **Modern Pathology**, v. 27, n. 12, p. 1559–1567, 11 dez. 2014.

PIROG, E. C. Cervical adenocarcinoma diagnosis of human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative tumors. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 141, n. 12, p. 1653–1667, 1 dez. 2017.

PIROG, E. C. *et al.* **Gastric-type Adenocarcinoma of the Cervix: Tumor With Wide Range of Histologic Appearances.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.anatomicpathology.com>.

QUEIROZ, C. *et al.* p16 INK4 aexpression as apotential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. **Pathol Res Pract.**, v. 202, n. 2, p. 77–83, 2006.

REAGAN, J. W.; HICKS, D. J. A study of in situ and squamous-cell cancer of the uterine cervix. **Cancer**, v. 6, n. 6, p. 1200–1214, 1953.

REAGAN, J. W.; SEIDEMANN, I. L.; SARACUSA, Y. **THE CELLULAR MORPHOLOGY OF CARCINOMA IN SITU AND DYSPLASIA OR ATYPICAL HYPERPLASIA OF THE UTERINE CERVIX.** [s.l: s.n.].

REIS, E. S. *et al.* Complement in cancer : **Nature Publishing Group**, 2017.

REIS, E. S. *et al.* **Complement in cancer: Untangling an intricate relationship.** **Nature Reviews Immunology** Nature Publishing Group, , 1 jan. 2018.

REVEL, M. *et al.* **Complement system: Promoter or suppressor of cancer progression?** **Antibodies** MDPI, , 1 dez. 2020.

RICHART, R. M. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 10, n. 4, p. 748–784, 1967.

RICHART, R. M. Cervical intraepithelial neoplasia. **Pathol. Annu.**, v. 8, p. 301–328, 1973.

RICHART, R. M. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. **Obstet Gynecol .** , v. 75, p. 131–133, 1990.

RICHART, R. M. Natural history of low-grade CIN. **19o International Papillomavirus Conference**, 2001.

RICKLIN, D. *et al.* **Complement component C3 – The “Swiss Army Knife” of innate immunity and host defense.** **Immunological Reviews** Blackwell Publishing Ltd, , 1 nov. 2016.

ROORYCK, C. *et al.* Mutations in the lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. v. 43, n. 3, p. 197–203, 2011.

ROUSE, J. *et al.* Interfaces Between the Detection , Signaling , and Repair of DNA Damage. v. 547, n. 2002, 2012.

SAITO, K. *et al.* PODXL1 promotes metastasis of the pancreatic ductal adenocarcinoma by activating the C5aR/C5a axis from the tumor microenvironment. **Neoplasia (United States)**, v. 21, n. 12, p. 1121–1132, 1 dez. 2019.

SELLORS, J. W.; SANKARANARAYANAN, R. **Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia : A Beginners ' Manual**. [s.l: s.n.].

SHULZHENKO, N. *et al.* **Ménage à trois: An evolutionary interplay between human papillomavirus, a tumor, and a woman. Trends in Microbiology** Elsevier Ltd, , 2014.

SIRMACI, A. *et al.* MASP1 mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of carnevale, malpuech, OSA, and michels syndromes. **American Journal of Human Genetics**, v. 87, n. 5, p. 679–686, 12 nov. 2010.

SKJOEDT, M. *et al.* A Novel Mannose-binding Lectin / Ficolin-associated Protein Is Highly Expressed in Heart and Skeletal Muscle Tissues and Inhibits Complement Activation *. v. 285, n. 11, p. 8234–8243, 2010a.

SKJOEDT, M. *et al.* Immunobiology MBL-associated serine protease-3 circulates in high serum concentrations predominantly in complex with Ficolin-3 and regulates Ficolin-3 mediated. **Immunobiology**, v. 215, n. 11, p. 921–931, 2010b.

SOLOMON, D. *et al.* **The 2001 Bethesda System Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.jama.com>.

SPURGEON, M. E.; LAMBERT, P. F. Human Papillomavirus and the Stroma : Bidirectional Crosstalk during the Virus Life Cycle. 2017.

STELZLE, D. *et al.* Estimates of the global burden of cervical cancer associated with HIV. **The Lancet Global Health**, v. 9, n. 2, p. e161–e169, 1 fev. 2021.

STOLNICU, S. *et al.* **International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification (IECC) A New Pathogenetic Classification for Invasive Adenocarcinomas of the Endocervix**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.ajsp.com>.

ŚWIERZKO, A. S.; CEDZYŃSKI, M. The Influence of the Lectin Pathway of Complement Activation on Infections of the Respiratory System. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. October, p. 1–11, 2020.

TAKADA, F. *et al.* **Localization of the Genes for the 100-kDa Complement-Activating Components of Ra-Reactive Factor (CRARF and Crafl to Human 3q27-q28 and Mouse 16B2-B3**. [s.l: s.n.].

TAKAHASHI, K. *et al.* Mannose-binding lectin and its associated proteases (MASPs) mediate coagulation and its deficiency is a risk factor in developing complications from infection, including disseminated intravascular coagulation. **Immunobiology**, v. 216, n. 1–2, p. 96–102, jan. 2011.

THE HUMAN PROTEIN ATLAS. Human Protein Atlas database. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000127241-MASP1>>. Acesso em: outubro de 2022.

THIEL, S. *et al.* A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. **Nature**, v. 386, p. 506–510, 1997.

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

THIEL, S.; JENSEN, L.; DEGN, S. E. A serine protease associated with humoral pattern-recognition molecules : normal and acute-phase levels in serum and stoichiometry of lectin pathway components. **CLIN EXP IMMUNOL**.v. 1, p. 38–48, 2012.

THOMAS, C. W.J., et al. 2006. Consensus Guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. **AM. J OBSTET GYNECOL.** V 4, n. 197, p.340-345, out 2007.

TJALMA, W. A. A.; DEPUYDT, C. E. Cervical cancer screening: Which HPV test should be used - L1 or E6/E7? **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 170, n. 1, p. 45–46, 2013.

UENO, S. *et al.* Absence of human papillomavirus infection and activation of pi3k-akt pathway in cervical clear cell carcinoma. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 23, n. 6, p. 1084–1091, jul. 2013.

UNIPROT. **UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.** Disponível em: <<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P48740/entry#P48740-4>>. Acesso em: outubro de 2022.

URQUHART, J. *et al.* Exploring the genetic basis of 3MC syndrome: Findings in 12 further families. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 170, n. 5, p. 1216–1224, 1 maio 2016.

VESCO, K. K. *et al.* Risk Factors and Other Epidemiologic Considerations for Cervical Cancer Screening: A Narrative Review for the U.S. **Preventive Services Task Force.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.annals.org>.

WENDLAND, E. M. *et al.* Prevalence of HPV infection among sexually active adolescents and young adults in Brazil: The POP-Brazil Study. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, 6 out. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cervical cancer.** 22 fev. 2022. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer#:~:text=Cervical%20cancer%20is%20the%20fourth,%2Dincome%20countries%20\(1\).>](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer#:~:text=Cervical%20cancer%20is%20the%20fourth,%2Dincome%20countries%20(1).>)>

WOOMAN, B. J. C., et al. The natural history of cervical hpv infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*, v.7, v.1, p. 11-22, janeiro 2007.

XING, B. *et al.* **Human Papillomavirus-Negative Cervical Cancer: A Comprehensive Review.** *Frontiers in Oncology*Frontiers Media S.A., , 17 fev. 2021.

YONGQING, T. *et al.* Mannose-binding lectin serine proteases and associated proteins of the lectin pathway of complement: Two genes, five proteins and many functions? **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1824, n. 1, p. 253–262, 2012.

YONGQING, T. *et al.* The X-ray crystal structure of mannose-binding lectin-associated serine proteinase-3 reveals the structural basis for enzyme inactivity associated with the carnevale, mingarelli, malpuech, and michels (3MC) syndrome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 31, p. 22399–22407, 2 ago. 2013.

YTTING, H. *et al.* Pre- and postoperative levels in serum of mannan-binding lectin associated serine protease-2 — a prognostic marker in colorectal cancer. **Hum. Immunol.**, v. 2, p. 414–420, 2008.

ZHANG, R. *et al.* **Role of the complement system in the tumor microenvironment.** **Cancer Cell International**BioMed Central Ltd., , 15 nov. 2019.

ZHOU, B. S.; ELLEDGE, S. J. checkpoints in perspective. v. 408, n. November, p. 433–439, 2000.

7 ANEXOS

ANEXO A

Multiplex 2 MASP1 -					
Reagentes	[Inicial]	[Final]		Int1+Int2	Int2
Tampão (x) - 15mM MgCl ₂	10	1,000	Mix 1:	18+20	14+85
Glicerol (%)	10	2,250	Mix 2:	17+20	13+84
MgCl ₂ (mM)	50	0,075	Mix 3:	17+19	13+85
dNTP (mM)	25	0,150	Mix 4:	18+19	14+84
Primer FCN2Ex8f	10	0,09			
Primer FCN2Ex8r	10	0,09			
In1 rs13094773 Gf/Af (17,18)	10	0,405			
In2 rs698105 Tr/Cr (19,20)	10	0,405			
In2 rs3864098 Cf/Tf (13,14)	10	0,3			
In2 rs 1108450 Ar/Cr (84,85)	10	0,3			
Taq Invitrogen(5U/ul)	5	0,050			
DNA	1	1,000			
H ₂ O					
Total					
Produtos esperados:					
FCN2 ex8		500 pb			
Int 1+Int2		731pb			
Int2		607 pb			

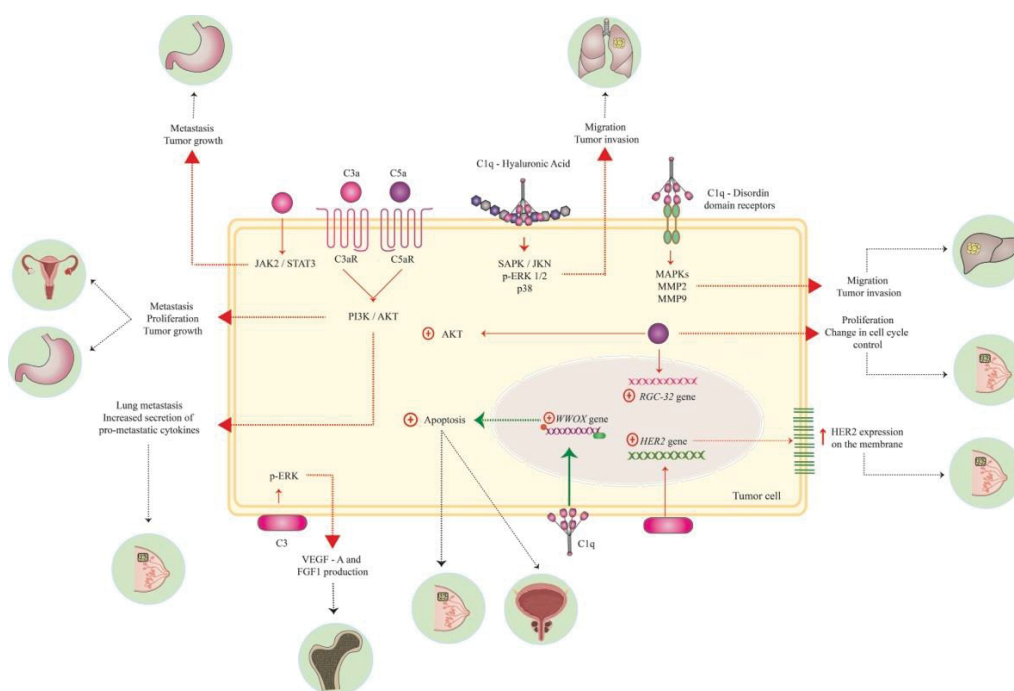
ANEXO B

Title: Non-canonical complement roles in cancer: a forgotten but crucial connection

Running Title: Non-canonical complement and cancer

ABSTRACT: The complement system (CS) within the tumor microenvironment (TME) play roles that go far beyond the activation and regulation of canonical pathways. Crosstalk between TME elements and tumor cells modifies the local immune response, inducing tumor progression. This scoping review includes 32 articles on the non-canonical functions of CS in carcinogenesis. Literature search was performed in PubMed and Web of Science. The C1q component has a dual role in cancer. C1q interaction with hyaluronic acid and disordin domain receptors has a protumor function leading to adhesion, migration, angiogenesis and metastasis. Also, C1q has an antitumor role, generating overexpression of the *WWOX* tumor suppressor gene. C3a, C5a, and their cell surface receptors have protumor actions, activating intracellular pathways, such as the PI3/AKT, JAK2/STAT3, ERK pathways, In addition, C5a induces expression of immunomodulators and immunoregulators in the TME, leading to overexpression of the *RGCC* gene and suppression of CD8 and CD4 T cells. Membrane attack complex and C7 components of the final pathway; CD59, CD46, and CD55 regulators; and factor H have protumor roles. Properdin is the only component to be tumor suppressor. The review highlights the important, and yet unclear, roles of CS components in cancer through pathways outside the CS.

● **GRAPHICAL ABSTRACT:**



Highlights

- In breast and colon cancers C1q an antitumoral role by activating an oncosuppressive pathway through overexpression of the *WWOX* oncogene.
- The C3a-C3aR and C5a-C5aR axes activate the PI3K/AKT and ERK/MEK1-2 pathways, affecting the cell cycle, cell proliferation, synaptic plasticity, p53 phosphorylation, and apoptosis.
- C3 activation at the tumor site acts as a negative regulator of the *Her2* oncogene and, in gastric tumor tissue, can lead to activation of the JAK2/STAT3 pathway.
- C5a promotes overexpression of the *RGCC* gene, which controls cell cycle progression.
- Properdin has an antitumor function by regulating TES transcription, which subsequently leads to increased expression of the DDIT3 proapoptotic transcription factor.

1 INTRODUCTION

Once either canonical or non-canonical pathways activate the complement system (CS) in the tumor microenvironment (TME), the initiated inflammatory process promotes tumor development (1). Thus, the role of the CS in the development and progression of cancer appears to be a double-edged sword. The TME composition has an essential role in complement performance, whose effects can range from sustained local and chronic inflammation and destruction of tumor cells coated with antibodies to inhibition of lymphocyte anti-tumor responses, leading to increased growth and invasiveness of cancer cells (2–4).

Cancer is one of the most common health problems worldwide. In 2020, 19.3 million new cases and almost 10 million deaths due to cancer were reported globally. According to the GLOBOCAN online database, an increase of 28.4 million cases of cancer by 2040 is predicted (5–8). Breast ($n=1,948,321$), lung ($n=1,587,642$), and colorectum ($n=1,354,134$) cancers rank highest in the predicted prevalence, with lung cancer having the highest predicted global mortality rate ($n=1,235,588$) (5,6).

The mechanisms underlying cancer development and progression are not completely understood. The TME is considered a key promoter of carcinogenesis, along with genetic and epigenetic factors (9–13). Alterations of these factors trigger and support local processes of inflammation, angiogenesis, and metastasis. Crosstalk between TME elements, tumor cells, and the CS can induce local inflammation and the consequent suppressed antitumor response, which facilitates tumor proliferation and invasion (14–17). The hypothesis that chronic inflammation is closely related to malignant tumor transformation and progression has been substantiated by human epidemiological data and genetic experiments in mice. However, the molecular and cellular factors involved in these processes have not yet been well characterized (18).

CS comprises a set of soluble, membrane-bound, and regulatory proteins with roles in inflammation, tissue regeneration, angiogenesis, tumorigenesis, immune surveillance, opsonization, and cell lysis. In addition, CS triggers an immune response through antibody-dependent and cell-mediated cytotoxicity, recruitment of immune cells, activation of the coagulation cascade, and regulation of intracellular pathways

(19). Moreover, CS connects the innate and adaptive immune responses, leading to several other biological events (19–21).

Complement activation causes proteolytic cleavage of key molecules via the classical pathway (CP), lectin pathway (LP), and alternative pathway (AP). CP activation occurs via antibody binding to the C1q-C1r/C1s complex. C1r and C1s serine protease cleaves C2 to C2a and C2b. The C1s serine protease cleaves C4 to C4a and C4b fragments (22,23). LP is activated by pattern-recognition receptors (PRRs) that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), damage-associated molecular patterns (DAMPs), and altered cell-associated molecular patterns (ACAMPs). Mannose-binding lectin (MBL), ficolins, and collectins are PRRs that are complexed with mannan-binding lectin serine protease 1 (MASP-1) or MASP-2, which can cleave C2 (MASP-2 only) and C4 (both MASPs). These two pathways produce the same C2aC4b C3 convertase. The AP is continuously activated at low levels by spontaneous hydrolysis of native C3(H₂O). Its interaction with factor B (FB) generates the C3FB complex, leading to FB cleavage to Ba and Bb by factor D (FD). Bb remains linked to C3, forming C3Bb, which is an AP C3 convertase. Properdin stabilizes C3bBb, providing a focal point for the anchoring of C3bBb to membranes, and is the only known positive regulator of complement (24) (**Fig.1A**).

After the formation of C3 convertase (C2aC4b or C3bBb), which cleaves C3 to C3a and C3b, the proteolytic cascade converges as the final lytic pathway. The C3a fragment is an anaphylatoxin that may bind to its cell receptor, C3aR. This binding influences several immunological processes. C3b provides continuity to the cascade, leading to the formation of C5 convertase, which cleaves C5 to C5a and C5b. C5a is a potent anaphylatoxin with several biological functions. C5b binds to C6, C7, C8, and C9 to form the membrane attack complex (MAC) C5b-9, which may disrupt cell membranes by causing lytic pores (24) (**Fig. 1A**).

Activation of complement is irreversible. Thus, regulators that are soluble or membrane-associated regulators play crucial roles by inhibiting or slowing down the complement proteolytic cascade. Among the CS regulators, MASP-3 and MASP-4 inhibit LP activation; CD46 or membrane cofactor protein (MCP), factor I (FI), and CD55 inhibit the formation of AP C3 convertase; and factor H (FH) binds to C3b and facilitates its enzymatic degradation. CD59 protein is a membrane-associated regulator that acts by preventing the final stage of MAC polymerization (23) (**Fig. 1A**). The effects of complement on the TME can range from local and chronic inflammation

that can have a pro/antitumor effect to the inhibition of antitumor lymphocytic responses, leading to increased growth and invasion of tumor cells (2-4).

Within TME cells, intracellular cleavage of C3 and C5 involves cathepsin L, renin, thrombin, and plasmin in a noncanonical intracellular pathways (**Fig. 1B**) (3,23,25). Thus, complement may play important intracellular roles in addition to canonical extracellular complement pathways (4), which are still poorly explored. It is essential and medical relevance to understand the action of complement components in the different cellular pathways, many of which are immunosuppressive and may determine/influence the clinical outcome. In light of available evidence, in this scoping review, we focused on understanding the relationship between CS components in a non-canonical CS pathway with tumor cells at TME.

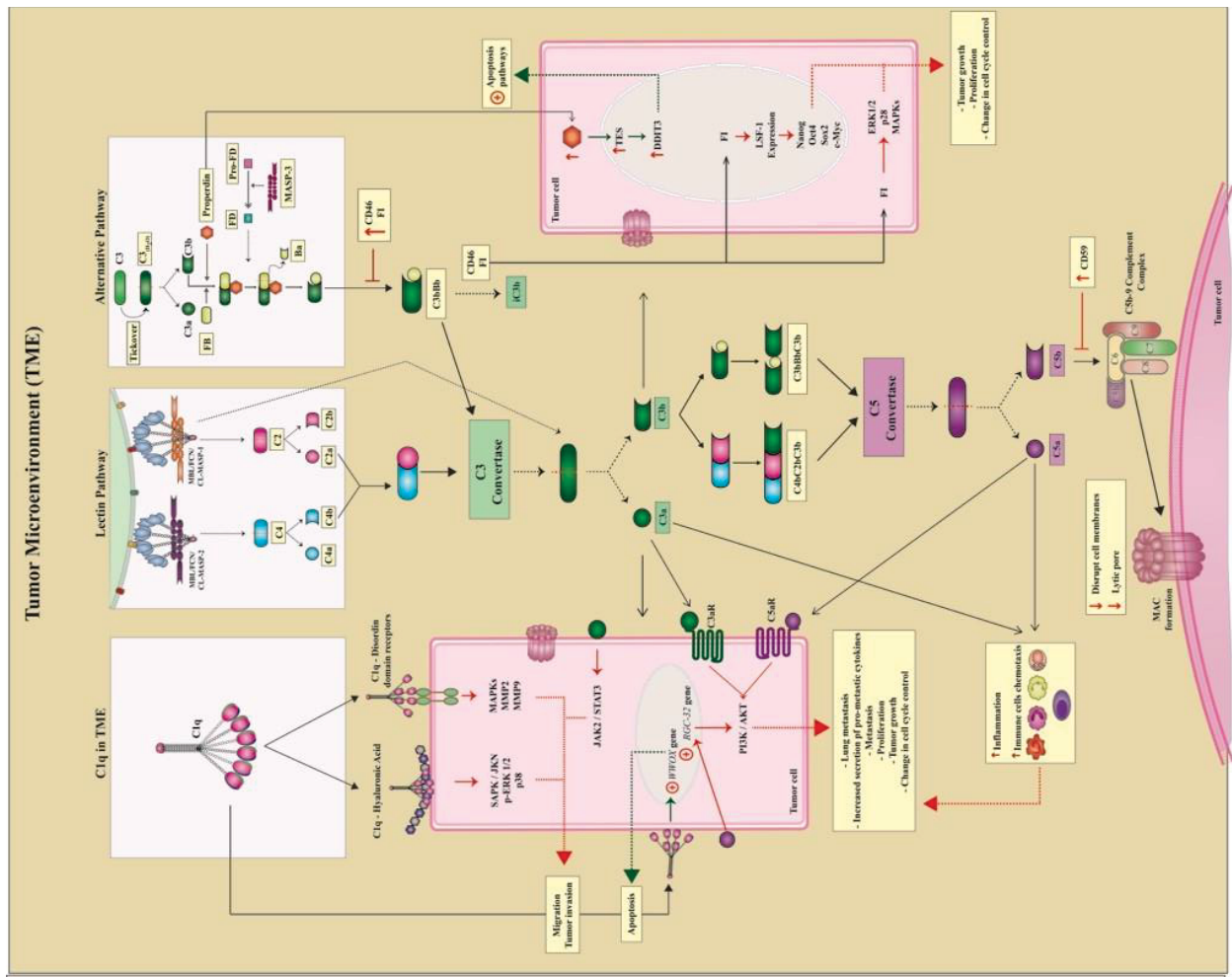
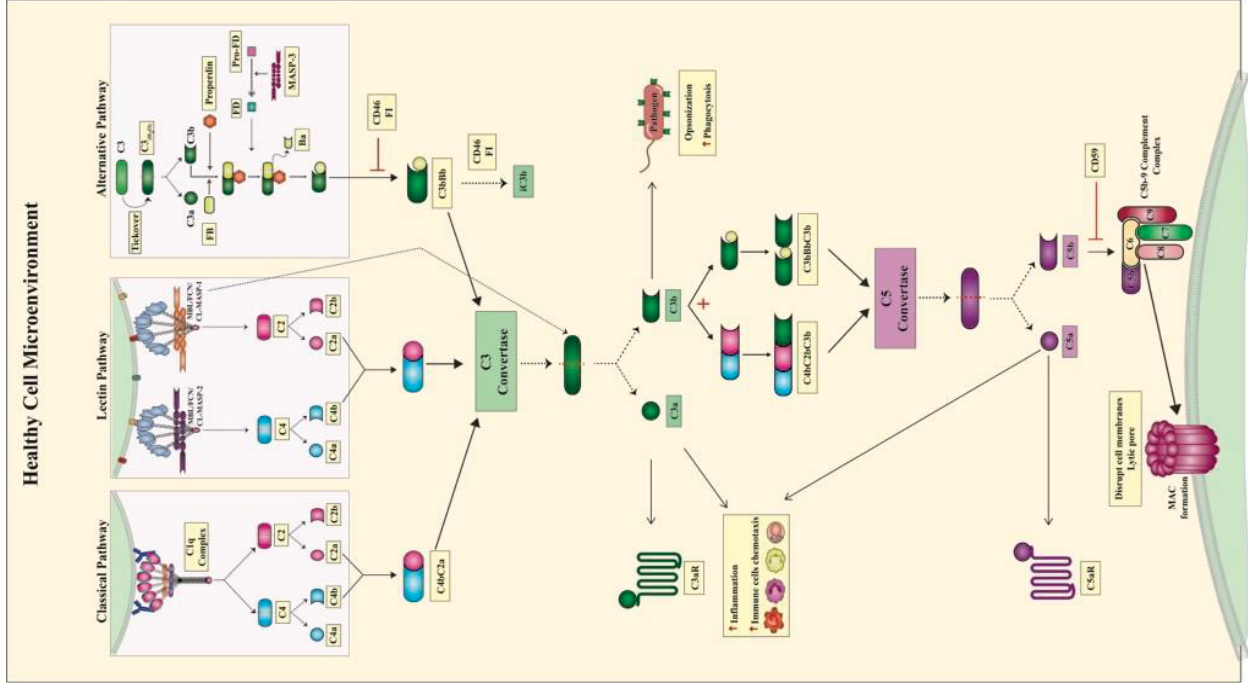


Figure 1. Complement system canonical and non-canonical pathways. A) There are three canonical CS pathways in the microenvironment of healthy cells: the classical pathway, lectin pathway, and alternative pathway. Different triggers activate all of them; however, these three pathways converge to form C3 convertase, a central complement enzyme. The C3 convertase cleaves C3 molecules into C3a and C3b. C3a is a potent anaphylatoxin capable of attracting immune cells and contributing to inflammation. C3b continues in the complement cascade and forms another essential enzyme, C5 convertase. C5 convertase cleaves C5 into C5a and C5b. C5a, just as C3a, is an anaphylatoxin, and C3b will follow the cascade and lead to the formation of the C5b-C9 complement complex, which will culminate in the formation of MAC. To ensure a controlled action of complement activation, complement regulators must act efficiently. **B)** In the tumor microenvironment, in addition to the canonical action of complement, there is also a non-canonical action. Complement proteins act in different intracellular pathways, leading to pro- or anti-tumor profiles in these cells. Tumor cells are pink. Green dotted arrows indicate the anti-tumor profile, and red dotted arrows indicate a pro-tumor profile.

2 METHODS

2.1 Data sources and literature search strategy

For this scoping review, we followed the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses extension for Scoping Reviews Checklist (26). A systematic search of the role of the CS in the TME was performed using two main databases: PubMed and Web of Science. For the descriptors search, we used

Mesh Terms in PubMed ("neoplasms"[MeSH Terms]) AND ("complement system proteins"[MeSH Terms]) and topic (Ts) in Web of Science (cancer AND (Complementsystem)) AND (OPEN ACCESS) AND (ARTICLE). A total of 550 articles were retrieved from PubMed and 69 from Web of Science. Thirty-two duplicated articles were identified using Excel software.

A. STUDY ELIGIBILITY – INCLUSION AND EXCLUSION CRITERIA

Two independent researchers (CFO-T and AGM) read the titles and abstracts. At this initial stage, of the 619 articles analyzed, 484 were excluded. The remaining 135 article listed in **Supplementary Table 1** were evaluated in the second stage. The inclusion criteria included the following: articles in English with available abstracts; open access; inclusion of human or animal models; *in vivo*, *in vitro*, or *in silico* studies; and published from 26 November 2010 to 26 November 2020 (**Fig. 2**). The exclusion criteria were articles whose subjects were not components of CS and cancer; studies classified either as review, commentary, editorial, letter, systematic review and/or meta-analysis, news, guideline, clinical trials/controlled trials, articles whose subjects were only, and patents. Articles with an exclusive focus on treatment strategies or drugs that inhibit CS components and/or that focused only on conventional complement pathways were also excluded. A total of 135 articles fulfilled the inclusion criteria and were analyzed (**Fig. 2**).

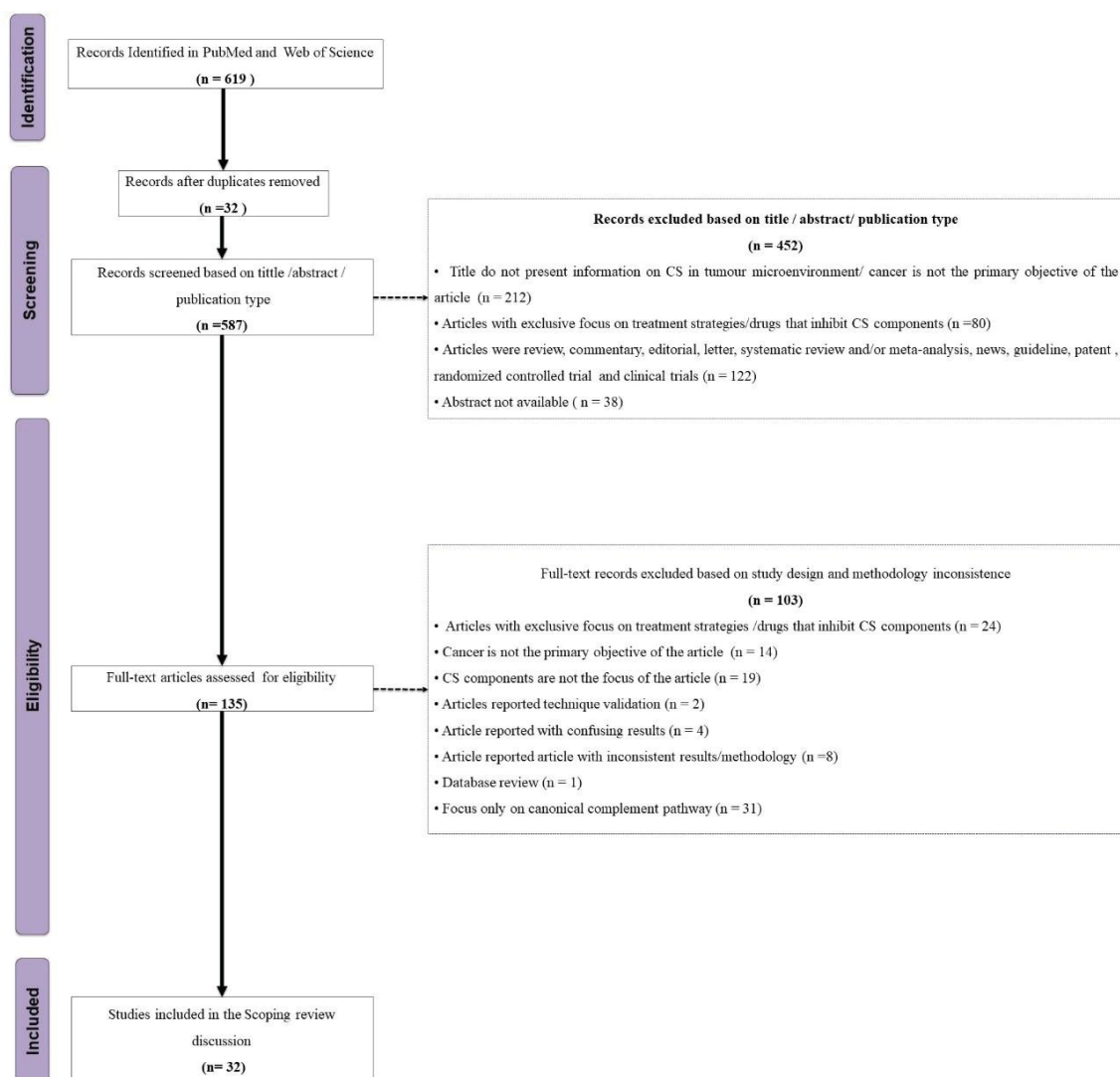


Figure 2. Flowchart of the study eligibility based on PRISMA-ScR.

Next, the all authors analyzed the full text of the 135 selected articles. The articles included at this stage are listed in **Supplementary Tables S1 and S2**. Doubts were discussed and resolved by consensus. Of the 135 articles, 103 articles were excluded at this stage as they did not meet the inclusion criteria. Finally, 32 studies were included in the analysis (**Fig. 2**). All the articles included first author's name, year of publication, title, experimental model, cancer type, methods, complement proteins involved, and antitumor/protumor tumoral role of the complement components in the context of cancer (**Supplementary Table S2**). All articles included in this review were classified according to their protumor and antitumor focus activities (**Supplementary Table S3**).

Additional expression and correlation information was obtained from the Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>) for all complement components and cancer types

included in this scoping review (27). The data on mRNA expression and survival rates are shown in **Supplementary Fig S1 to S2**.

3 RESULTS AND DISCUSSION

C1 COMPLEX

Starting in the mid-1920s, the first four CS elements were described and sequentially designated C1 to C4 (28,29). The C1 complex is composed of three proteins, C1q, C1r, and C1s. C1q is the recognition unit that the C1r and C1s serine proteases bind to (28,29). C1q has a structural protein configuration composed of a globular region and collagen-like domain. The globular region has three different subunits, A, B, and C encoded by three distinct genes located on human chromosome

1. The subunits form a trimer capable of recognizing a wide range of ligands. The collagen-like domain is the binding region for C1r and C1s serine proteases (30). Activation of the C1q-C1r₂-C1s₂ complex triggers CP, leading to the cleavage of C2 and C4 components, generating C3 convertase (31).

Beyond CP activation, C1q is a versatile molecule with many other activities. It interacts with complement receptor 1 (CR1), promotes phagocytosis of opsonized elements by mononuclear phagocytes, and regulates their cytokine profile (31). C1q-stimulated macrophages upregulate pro-phagocytic genes, increase their phagocytic activity, alter the anti-inflammatory cytokine profile. These activities result in suppressed expression of interleukin (IL-1) alpha and beta, and increased secretion of IL-10 (interleukin 10), IL-1 receptor antagonist, monocyte chemoattractant protein-1, and interleukin-6 (IL-6) (32,33). Moreover, C1q has a relevant anti-inflammatory role in maintaining homeostasis by binding and promoting clearance of immune complexes by monocytes/macrophages and erythrocytes (34,35). However, local TME production of C1q, mainly by tumor-associated macrophages (TAMs), is associated with poor cancer prognosis (36). TAMs exhibit an M2-like profile and contribute to high local concentrations of C1q, which can lead to CP activation, exacerbation of inflammation, and activation of complement-independent pathways (36,37). The various roles of the C1 complex in non-canonical complement pathways are discussed below (**Supplementary Table 3**).

NON-CANONICAL ROLE OF C1Q AND C1R/C1S IN CANCER

Different TME cells, including monocytes, TAMs, and monocytoid B cells, produce high levels of C1q (2,36,38) (**Fig. 1B**). The expression of C1q by monocytic cells in the TME

was confirmed through tissue colocalization of C1q with the CD68 surface marker of the macrophage lineage. The findings suggest that TAMs with an

M2-like profile are the likely source of C1q (38). Moreover, C1q deposition has been observed in different types of cancers, including cervical adenocarcinoma, melanoma, lung adenocarcinoma, and breast and pancreatic adenocarcinoma. However, whether the deposition has a pro- or antitumor role is still unclear. In addition, C1qA chain deficiency results in prolonged survival and smaller tumors *in vivo* (2). Interestingly, deposition of other CS components does not seem to occur in most tumors, suggesting that C1q is expressed by tumor or TME cells, and acts independent of complement activation (2). Expression mRNA profiles for the A, B, and C chains of C1q differ according to the tumor type (Supplementary Fig. S1). In the context of renal cancer, high *C1QA*, *C1QB*, and *C1QC* expression is unfavorable for patient survival (Supplementary Fig. S1) (27).

High C1q levels represent a favorable prognosis for human epidermal growth factor receptor 2 positive (Her2+) and basal-type breast cancer patients, but are pro-tumoral for lung and kidney cancer (38). *In vitro* studies have shown that C1q binds to high-molecular-weight hyaluronan (HMW-HA) (39). This binding induces adhesion and proliferation of mesothelioma cells through increased phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1)/ERK2, stress-activated protein kinase/Jun amino-terminal kinase (SAPK/JNK), and p38, regardless of complement activation (39). SAPK/JNK are members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family that have important roles in the regulation of cell death, survival, growth, and proliferation (40). In normal cells, sustained activation of ERK1/ERK2 is required for progression from G1 to the S phase, and is associated with the induction of positive cell cycle regulators and inactivation of antiproliferative genes (41). Thus, activation of these two pathways by C1q-HWM-HA binding is expected to favor tumor development. Further studies are needed to confirm this hypothesis.

In hepatocellular carcinoma (HCC), C1q binding to discoidin domain receptors (DDR) promotes tumor cell migration and tissue invasion (42). The C1q-DDR interaction also affects MAPKs, similar to the interaction observed in C1q-HWM-HA (39). C1q-DDR interacts with matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 (42). These data support the idea that C1q increases the aggressiveness of liver cancer by interacting with the DDR. However, in breast and prostate cancers, C1q recognition launches an intracellular signaling pathway that activates the expression of the *WW domain-containing oxidoreductase* (*WWOX*) tumor suppressor gene. In these tumors, low C1q deposition causes cell proliferation and prevents cell apoptosis (43,44) (**Fig.3**).

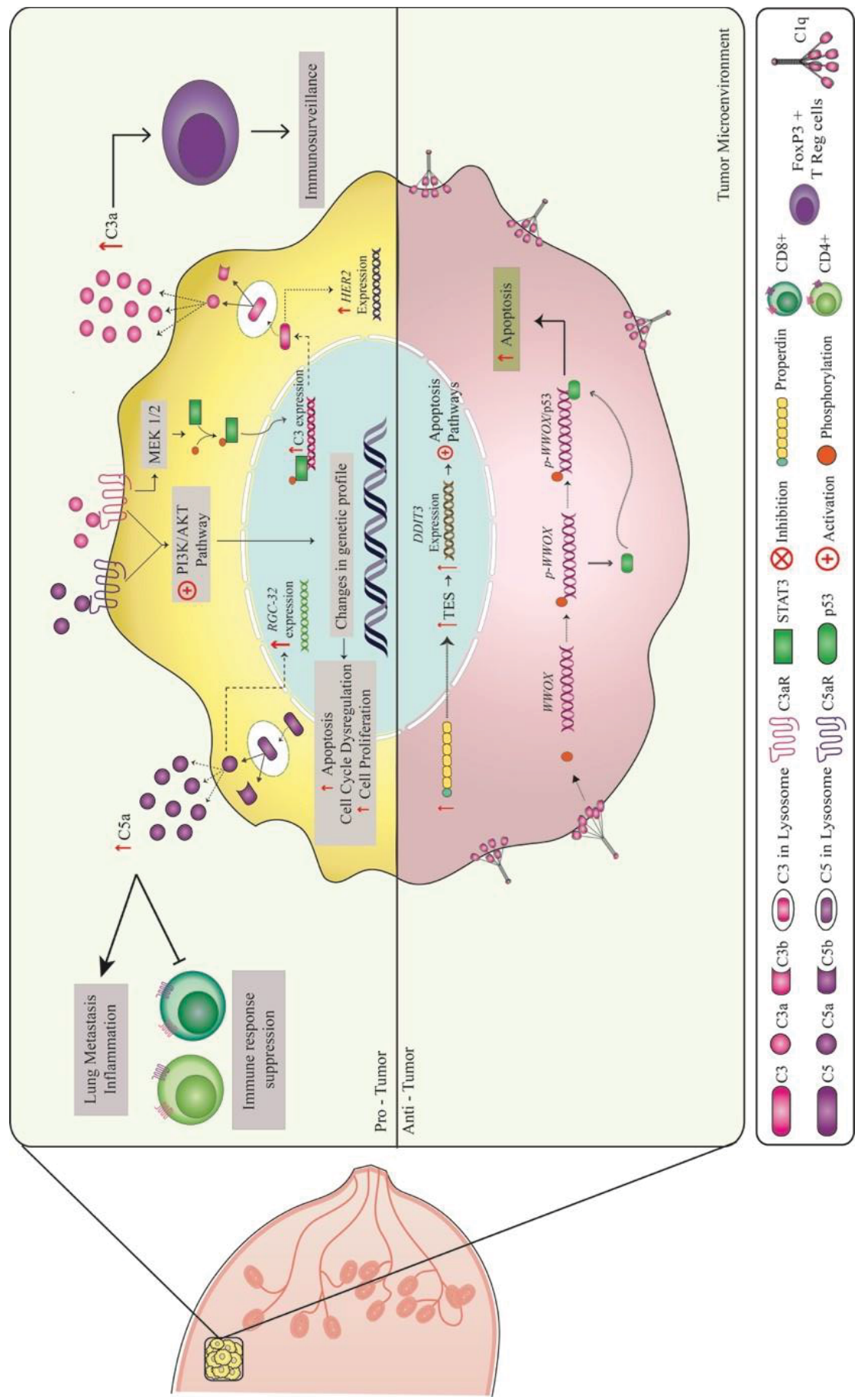


Figure 3 - Non-canonical pathways of complement in breast cancer. Complement components play a role in both anti-tumor and pro tumor responses. The molecules C1q and properdin have an anti-tumor action on breast cancer (38,44,99,100). The binding of the C1q molecule to the cell at the

breast tumor membrane leads to Tyr33 site phosphorylation of the WWOX protein, enabling the binding of p53 to WWOX. The p-WWOX-p53 formed complex is carried to the mitochondria/nucleus, where it activates apoptosis pathways (43,44). The high expression of intracellular properdin in tumor cells induces stress on the endoplasmic reticulum leading to the expression of molecules that act in the increase of TES transcription, causing an increase in the expression of the *DDIT3* gene activating apoptotic pathways. In this way, both C1q and properdin contribute to eliminating the tumor cell. On the other hand, on the C3a-C3aR and C5a-C5aR axis, CD46 and CD59 may have a pro-tumor action. Activation of the C3a- C3aR axis leads to the PI3K/AKT activation and the MEK1/2 pathways (54,55). The PI3K/AKT pathway and a key regulator in the cellular processes involved in cell growth, metabolism, motility, survival, and apoptosis. Uncontrolled activation of this pathway promotes tumor cell survival and proliferation, leading to tumor progression and resistance to cancer therapies. The intracellular production of C5a leads to the C5a-C5aR axis, which can activate the PI3K/AKT pathway. C5a also promotes the overexpression of the *RGC-32* gene (complement response gene 32), which controls cell cycle progression. The high expression of the regulators CD46 and CD55 can potentially worsen prognosis and inhibit apoptosis, respectively. In addition, C3 was shown to be involved in tumor immunosurveillance, probably by interactions with FOXP3+ T (Tregs), cells that are essential in the maintenance of immune tolerances and immune homeostasis. Thus, the combined action of these components can have a crucial effect on the clinical outcome.

In contrast to the former examples, cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) lines express high mRNA and protein levels of C1r and C1s, but not C1q (45). These cell lines secrete C1s and C1r, leading to their activation in a C1q-independent manner. Subsequently, the activation of latent MMP9 occurs with the inhibition of ERK1/2 and Akt activation, indicating a possible role of C1s in tumor promotion, growth, angiogenesis, and metastasis. Thus, both C1r and C1s may contribute to cSCC tumor progression (45).

The collective findings presented in this subsection indicate that non-canonical C1-dependent functions appear to play a dual role in tumors. C1q may stimulate the development of different tumors, such as cSCC, breast, prostate, and HCC, probably through the association of C1q with other molecules, such as hyaluronic acid and DDRs, promoting adhesion, migration, angiogenesis, and metastasis. In contrast, C1q may play an oncogenic role by activating the *WWOX* tumor suppressor in breast and prostate cancer cells. Finally, C1q-associated serine proteases C1r and C1s may play a pro-tumoral role in cSCC tumors independent of C1q (2,36,38–40,42–45).

C3 component in cancer

Under physiological conditions, C3 is continuously activated in plasma due to its spontaneous hydrolysis, which occurs at a medium rate of 1% of the total C3 per hour. This may lead to AP activation, contributing to up to 80% of the general complement response, even after CP and LP are activated. These three complement pathways converge in the formation of C3 convertase, leading to the cleavage of C3, the central component of the cascade. C3 is a 185 kDa glycoprotein encoded by the *C3* gene on chromosome 19 (locus p13.3). Cleavage of C3 by C3 convertases results in two products: C3a and C3b. The AP C3 convertase further creates an amplification loop for C3b deposition on cell membranes (24) (**Fig. 1A**).

C3a acts as an anaphylatoxin and induces various effects upon binding to the C3aR receptor on myeloid cells. These effects include chemotaxis, cell activation, and inflammatory processes (46). The cleavage of C3 to C3b exposes previously hidden thioester bonds, which enable covalent binding to several cell surface molecules and immune complexes. The interaction of C3b with either the CR1/CD35 or CD46 complement regulator leads to the degradation of C3b to iC3b, following removal of the C3f peptide and/or C3dg. These fragments interact with various complement receptors and mediate immune adhesion, phagocytosis, and adaptive stimulation (24).

ACTIVATION OF NON-CANONICAL COMPLEMENT PATHWAYS BY C3, C3A, C3AR AND IC3B

ERK/MAPK kinase 1 (MEK1) and MEK2 are widely expressed intracellular signaling molecules involved in the cell cycle. These kinases regulate cell proliferation, synaptic plasticity, p53 phosphorylation, and apoptosis (41). In human bone osteosarcoma epithelial cells (U2-OS) exposed to normal serum with C3, ERK phosphorylation was higher than that in U2-OS cells treated with heat-inactivated serum. This increased phosphorylation was associated with AP complement-mediated production of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and fibroblast growth factor angiogenic growth factors, which may indicate a mechanism for AP-mediated tumor angiogenesis (47).

C3 plays a pro-tumoral role in cancer. Higher C3 mRNA levels are unfavorable for the survival of patients with renal cancer (Supplementary Fig. S2) (27). Although high C3 plasma levels are associated with increased survival of patients with HCC, this may simply reflect normal C3 production by differentiated hepatocytes (27).

In prostate cancer, *in vitro* inactivation of iC3b by prostate fluid with prostate-specific antigen generates a new 37 kDa fragment, which was smaller than the C3b fragment derived from the canonical CP. This cleavage is independent of FH and FI, supporting the hypothesis that complement components do not participate in the generation of this iC3b fragment. The iC3b fragments generated in the prostatic fluid appear to confer an immunosuppressive profile to the tumor. However, further investigation of the biological function of this iC3b molecule in prostate cancer is required (48).

In NeuT mouse models of breast cancer, C3 cleavage provided evidence that the early stages of CS activation occur at the tumor site. C3 deposition and accumulation was observed in the vessels and stroma undergoing tumorigenesis in the mammary gland, but not in the surrounding tissue. Whether this process results in MAC assembly on NeuT tumor cells is unclear, since cancer cells with high expression of *Her2* also have higher expression of the complement regulator CD55 (49). Since a sharp increase in the carcinoma growth rate was accompanied by an increase in *Her2* expression, it was suggested that C3 activation at the tumor site might positively regulate this gene (49) (**Fig. 3**). In *Her2*⁺ breast cancer, C3 is involved in tumor immunosurveillance, probably through interactions with FOXP3⁺ T (Treg) cells, which are essential for the maintenance of immune tolerance and immune homeostasis (50) (**Fig. 3**).

In contrast, in lung cancer, C3 signaling inhibits the production of multiple cytokines by CD4⁺ T cells, independent of FOXP3⁺ Tregs. In this case, CD4⁺ T cells can produce and cleave C3 intracellularly via cathepsin, thereby increasing the

production of interferon-gamma (IFN γ) (51,52) (**Fig. 4**). Thus, intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation, which is likely the main pathway of C3 action involved in the growth and development of lung cancer.

The deposition of C3 fragments on gastric cancer cells leads to the activation of the Janus kinase 2/Signal transducer and transcription protein activator 3 (JAK2/STAT3) pathway, which increases the levels of phosphorylated STAT3 (p-STAT3) and IL-6. Since p-STAT3 protein acts as a transcription factor, promoting cell proliferation and migration, C3 may act as an upstream regulator of JAK2/STAT3 activation in gastric cancer, with both C3 activation and deposition playing a role in gastric tumor growth and metastasis (53).

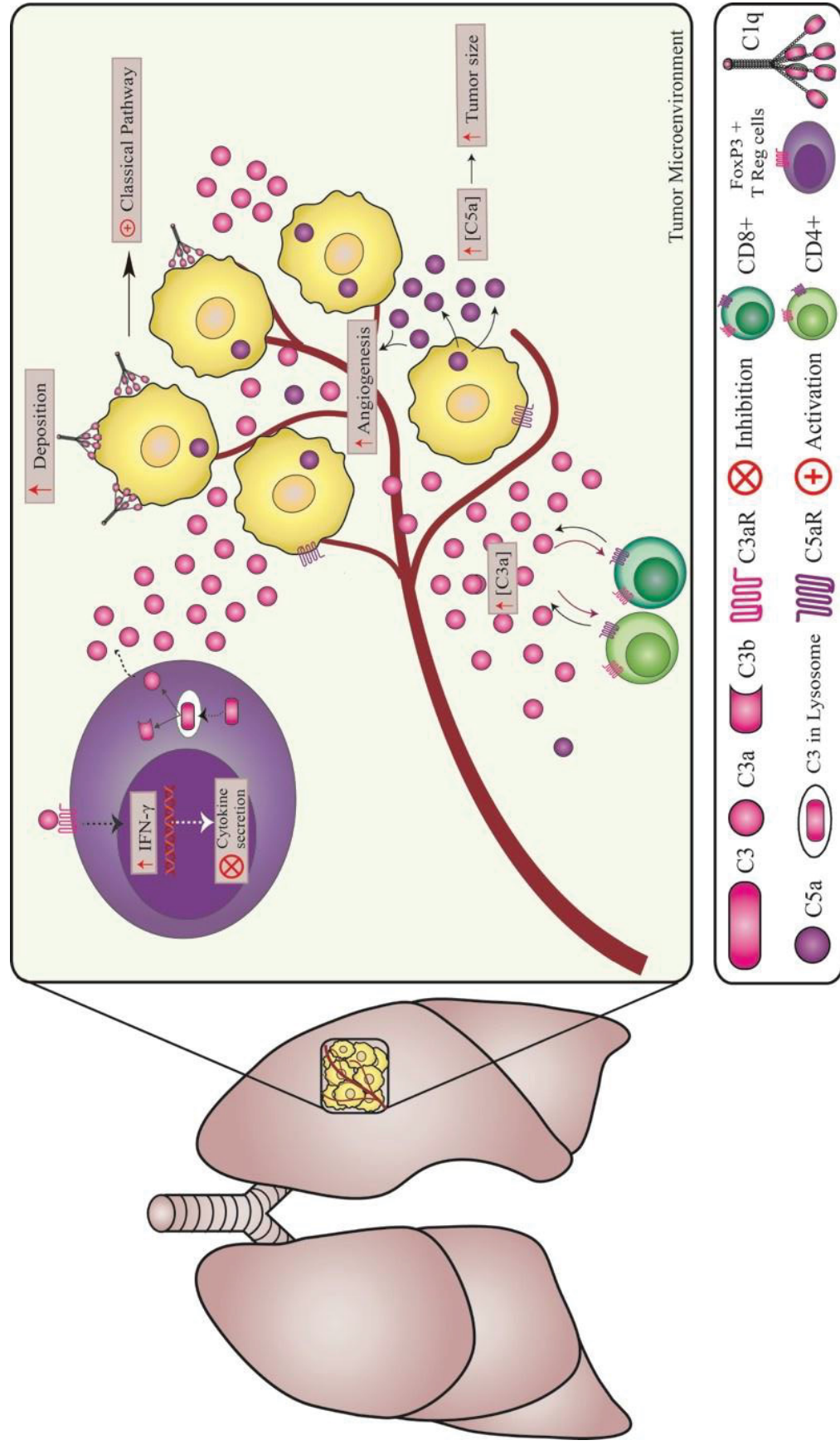


Figure 4 - Non-canonical complement pathways in lung cancer. Complement components play a crucial role in the progression of lung cancer. C1q acts in promoting angiogenesis independently of C5activation (2). The origin of intracellular C5a in cancer cells is unknown. Increased extracellular C5a leads to tumor growth and promotes angiogenesis (65,66). High deposition of factor H on the tumor cell membrane contributes to tumor progression and can be considered a marker for lung adenocarcinomas. A high concentration of C3 in the TME reduces CD4 T cells, promoting metastasis and growth

in tumor size. In addition, CD4+ T cells can produce and cleave C3 intracellularly via cathepsin leading to the regulation of IFN γ (interferon-gamma) secretion (51,52).

In ovarian cancer cells, C3a binding to C3a receptor (C3aR) increases the activity of the PI3K/AKT/mTOR intracellular pathway, promoting protein synthesis, cell proliferation, survival, and motility by inducing *AKT* mRNA levels and phosphorylation of p85 (a regulatory subunit of PI3K) and AKT protein. Similarly, in an animal model of ovarian cancer, the interaction of C3a and C3aR in ovarian cancer cells induced activation of the PI3K/AKT intracellular pathway, thereby increasing C3 secretion, as well as tumor growth and proliferation through a C3-dependent autocrine effect (54) **(Fig. 5)**.

Similarly, C3a-C3aR signaling promoted lung metastases of breast cancer in a murine model, leading to increased secretion of pro-metastatic cytokines and expression of extracellular matrix components through PI3K-AKT signaling in carcinoma-associated fibroblasts (55) **(Fig. 2B and Fig. 3)**. Activation of the PI3K/AKT pathway contributes to the definition of the tumor profile, as its exacerbated activation is a hallmark of cancer (55).

In summary, non-canonical C3 functions play a protumor role in cancer. The PI3K/AKT intracellular pathway is often activated by the interaction of C3a-C3aR in different types of cancer cells. In addition, the JAK2/STAT3 and ERK pathways are also activated by C3 fragments and together may lead to pro-tumoral cellular changes, creating a tumor immune microenvironment favorable for tumor development.

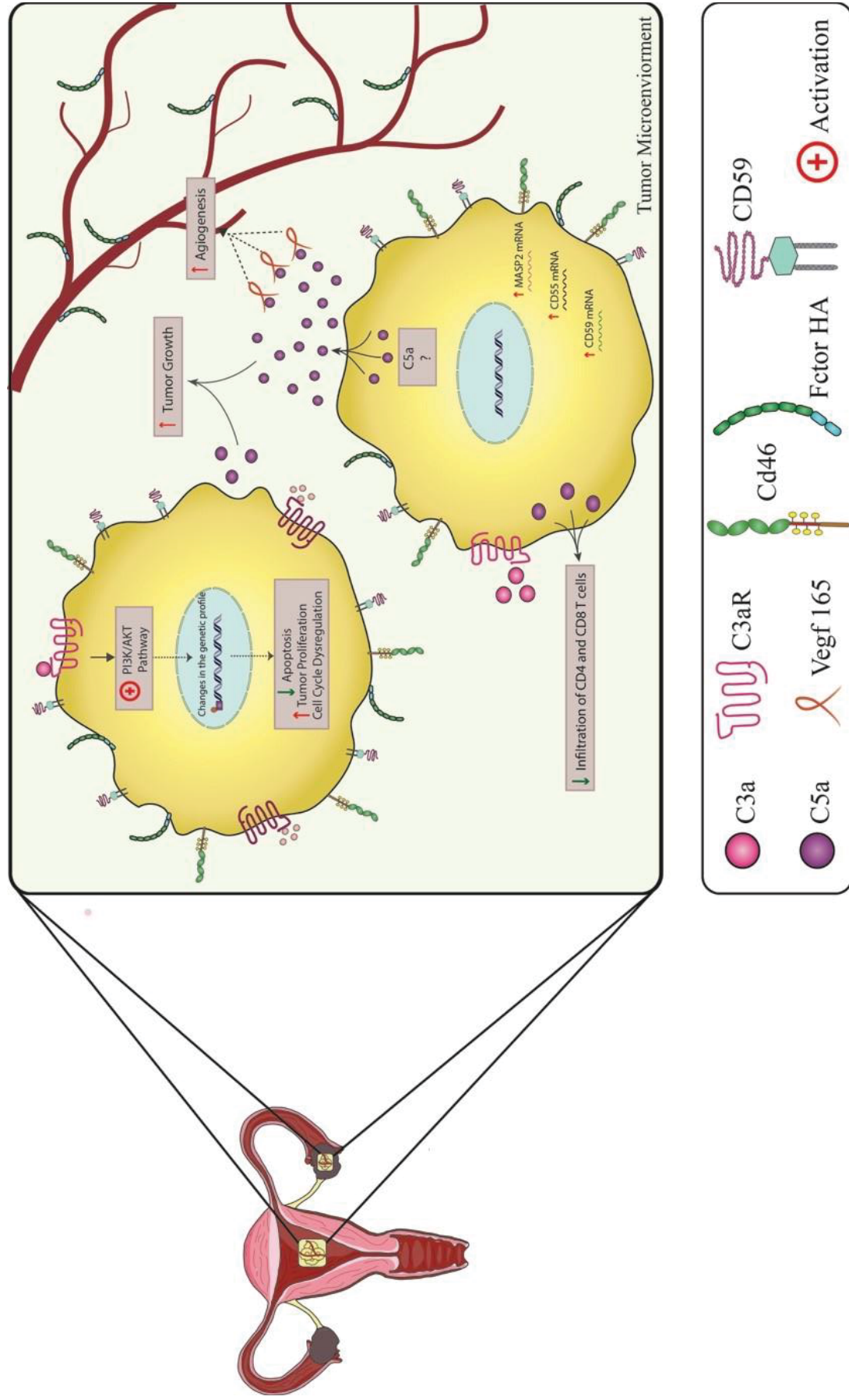


Figure 5 - Non-canonical complement pathways in ovarian cancer. Complement components have a pro-tumorigenic role in ovarian cancer. C3a binding to C3aR increases the activity of the PI3K/AKT/mTOR intracellular pathway, promoting protein

synthesis, cell proliferation, survival, and motility by inducing AKT mRNA levels and phosphorylation of p85 (a regulatory subunit of PI3K) and AKT protein. The interaction of C3a and C3aR in ovarian cancer cells induces activation of the PI3K/AKT intracellular pathway, thereby increasing C3 secretion, as well as tumor growth and proliferation through a C3-dependent autocrine effect (54). The secreted C5a initiates the autocrine loop that increases cell proliferation and promotes metastasis (58–60). High expression of C5a affects the levels of immunoregulators such as arginase, nitric oxide synthase, vascular endothelial growth factor and TNF- α in the TME, which decreases the infiltration of CD4+ and CD8+ T cells and stimulates tumor growth (18). IL-6 and IL-8 play important roles in the overexpression of CD55 and CD59 (95). Their increased expression on cell membranes also occurs in the fluid phase in ovarian and uterine cancer (83).

3.2. C5 COMPONENT IN CANCER

The final phase of the CS cascade involves C5 convertase, which catalyzes cleavage of the C5 molecule into C5a and C5b fragments. The C5b fragment forms a complex with C6, C7, and C8 molecules (C5b-8), which bind to the cell membrane and attract multiple C9 molecules with subsequent MAC formation (C5b-C9) (56). MAC assembly promotes the formation of pores in target cells, causing disruption, cell lysis, and death (23). C5a is a potent anaphylatoxin that acts as a chemoattractant for neutrophils, monocytes, and macrophages (56). In addition, C5a can modulate cytokine expression of several cell types with roles in the activation of coagulation pathways and the formation of neutrophil extracellular traps. C5aR1 and C5aR2 are specific cell receptors for C5a that belong to the rhodopsin family of receptors coupled to the G protein. C5aR1 and C5aR2 are mainly expressed by myeloid lung and liver cells, and their activation promotes a variety of local responses depending on the cell type. Its relevance in cancer is related to the generation/modulation of anti-apoptotic responses (57) (**Fig. 1A**). The C5 protumor role is discussed below.

3.2.1. NON-CANONICAL ROLE OF C5A AND C5AR IN CANCER

Similar to C3, C5 also plays a pro-tumoral role, which results from the activation of non-canonical complement pathways. Some types of cancer cells, such as lung, colon, ovarian, and bile duct, secrete C5a into the TME. The secreted C5a initiates the autocrine loop that increases cell proliferation and promotes metastasis, characterizing a C5a protumor profile (58–60). Although C5 positive liver cancer is associated with increased patient survival, as previously discussed for C3, its higher expression reflects preserved liver function (27).

In lung cancer cell lines and tissues, C5a contributes to an immunosuppressive microenvironment by creating a TME favorable to cancer progression through

recruitment of myeloid-derived suppressor cells and induction of expression of different immunomodulators, including arginase 1 (ARG1), proteins associated with cytotoxic T lymphocyte 4 (CTLA-4), IL-6, IL-10, lymphocyte activation 3 (LAG3) and programmed cell death 1 ligand 1 (CD274, PD-L1 or B7H1) (58) (**Fig. 4**). Similarly, in ovarian cancer, high expression of C5a affects the levels of immunoregulators such as arginase, nitric oxide synthase, vascular endothelial growth factor, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the TME, which decreases the infiltration of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and stimulates tumor growth (18) (**Fig. 5**).

In lung, colon, ovarian, and bile duct cancers, C5a does not seem to be produced by the activation of CP and AP. Rather, C5a production may be the result of the LP pathway, which has not yet been evaluated (58–60). *In vitro*, lung cancer cells produce C5a, but not factor B, properdin, C1q, C1r, C1s, C1, or C4. However, C5a expression was reportedly affected by the local production of trypsin-like serine protease inhibitors, which may inhibit MASP-1, the only complement serine protease with trypsin-like activity and a crucial role in LP activation. Thus, LP activation may be involved in C5a tumor production. This remains speculative, since assays with LP serine proteases have not been performed.

In human breast cancer cell lines, C5a promotes overexpression of the *RGCC* gene (a response gene to complement 32 protein), which is induced by the C5b-9 complement component and plays a role in controlling the progression of the cell cycle (61). Moreover, activation of the Akt pathway is required for C5a-induced expression of *RGCC* and breast cancer cell proliferation (61) (**Fig. 3**). In addition, C5a-C5aR signaling induces lung metastasis, a common event in breast cancer, by suppressing CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses *in situ* and generating T regulatory cells (Tregs) (62) (**Fig. 4**). The mechanism of C5aR-mediated suppression of T cells in the metastatic target involves the recruitment of immature myeloid cells and increased production of transforming growth factor beta (TGF- β) and IL-10, favoring the generation of Tregs and Th2-oriented responses that render CD8⁺ T cells dysfunctional (62).

In gastric cancer, C5a-C5aR interaction regulates the expression of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinase, through the PI3K/AKT axis (63). Moreover, high C5aR expression in gastric cancer tumor cells increases their invasiveness and facilitates liver metastasis, which is associated with poor prognosis. Specifically,

C5a-C5aR signaling increases the conversion of RhoA-guanosine diphosphate to RhoA- guanosine triphosphate in the cytosol, inducing cytoskeletal rearrangement and invasiveness (64). In renal carcinoma cells, activation of the C5a-C5aR axis was associated with worse prognosis, with C5a triggering ERK and PI3K-dependent invasion of renal carcinoma cells expressing C5aR (65,66).

In metastatic pancreatic invasive ductal adenocarcinoma (PDAC), podocalyxin-like protein 1 (PODXL1) interacts with C5aR on the cell membrane. Activation of the receptor increases cellular motility, thereby conferring invasive and metastatic properties to PDAC cells (67). C5aR1 signaling in melanoma cells acts directly and indirectly in the induction of chemokines, such as chemokine C-C motif ligand 2. The induction attracts immunosuppressive populations of myeloid cells, thereby promoting infiltration of leukocytes with an immunosuppressive profile in the TME. In contrast, C5aR2 has a more restricted but beneficial role in limiting tumor growth (suppression of tumor growth) (68).

In summary, C5a and its cellular receptor, C5aR, have important pro-tumoral functions in different tumor types via non-canonical complement pathways. C5a-C5aR binding to tumor cells is associated with low overall survival and recurrence-free survival, and increased incidence of microvascular invasion and metastasis (65,66) (**Fig. 1B, 3, and 4**).

FINAL COMPLEMENT LYTIC PATHWAY IN CANCER

The final complement lytic complex is the common intersection between the three complement pathways, which damages the plasma membranes of target cells or microorganisms and leads to osmotic lysis (69). The sequentially activated C5 convertases C4bC2bC3b in the CP and LP pathways and C3bBbC3b in the AP split C5 into the C5a and C5b fragments. C5b, together with C6, C7, C8, and C9, constitute the MAC, which is inserted into the cell membrane as transmembrane lytic pores on target cells (cancer cells, infected cells) or microorganisms, eventually leading to cell death (70,71) (**Fig.1B**). MAC activity is essential for maintaining cell and tissue homeostasis, promoting protection against infections, and clearing immune complexes. Although the expression of complement regulators in most tumors restricts CS activation, sublytic MAC deposition on cancer cells increases intracellular calcium ion (Ca^{2+}) levels, modifies cellular functionality, and causes cell damage (72,73). MAC

also maintains tumor-associated inflammatory signaling and plays a dual role in cancer (69,74,75).

Non-canonical complement activities by MAC and C7 in cancer

Exposure of cancer cells to sublytic levels of MAC changes the expression of G protein and Ca^{2+} signal transduction factors (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor interacting protein and regulator of G protein signaling 16), transcription factors (early growth response 1 and 2), and inflammatory response genes (interferon regulatory factor 1), as well as of four other extracellular protein-related genes (*amphiregulin*, *C-X-C motif chemokine ligand 1*, *MMP3*, and *MMP13*), affecting cell proliferation and survival. Thus, sublytic MAC deposition on cancer cells is a potent tumor modulator that stimulates tumor progression (73).

Component 7 (C7) is an essential part of MAC. C7 overexpression in HCC cell lines promotes cell growth *in vivo*, increases late simian virus SV40 factor (*LSF-1* or *TFCP2* gene) protein levels and expression of stemness factors, such as POU Class5 homeobox 1 (Oct4), SRY-box transcription factor 2 (Sox2), and MYC proto-oncogene transcription factor (c-Myc). These changes in gene expression sustain their replication capacity in liver tumor-initiating cells, whereas C7 suppression inhibits tumor formation *in vivo* (76). Furthermore, high levels of C7 mRNA in liver cancer lead to shorter patient survival (27). In contrast, C7 overexpression can suppress colony formation of non-small cell lung cancer cells (NSCLC) *in vitro*, whereas lower C7 expression has been associated with worse outcome, clinical stage, and grade, as well as higher chances of relapse and death (77). Thus, the type of cancer and TME are decisive role in the anti- or pro-tumorigenic activity of C7.

Taken together, the evidence suggests distinct functions for MAC and C7 in cancer. The available evidence support the idea that components of the lytic pathway are individual driving factors in the tumor immune response and surveillance. However, further investigation is required to elucidate their *in vivo* effects on carcinogenesis and tumor progression.

CS REGULATORS IN CANCER

Complement activation results in several biological processes that go beyond their protective role and can even be harmful. Thus, the protection of self-tissues from complement-mediated damage is performed by several soluble or membrane-bound regulators. Each cell type relies on a combination of complement regulatory proteins (CRP) that bind at different points in the cascade. In tumors, well-known membrane-bound CRPs are cluster of differentiation (CD)46, CD55, and CD59 (78). Soluble CRPs are FI, FH, and properdin. CD46 or MCP protects autologous cells from complement attack by acting as a cofactor for FI-mediated proteolytic cleavage of C3b and C4b (79,80) (**Fig. 1A**).

Although CD46, CD55, and CD59 are important complement regulators expressed in almost all cell types and tumor cells, they each have opposing roles. Although they prevent complement-mediated autologous lysis in normal cells, their abnormal overexpression hinders complement effectiveness, favoring tumor cell survival and development. Thus, membrane-bound CRPs (mCRPs) may function as biomarkers of malignant transformation (79,81–84). CD59 is expressed in most tumor cells. CD59 consists of a glycosylphosphatidylinositol anchored membrane protein that prevents both C9 polymerization and connection of the C9 units to the C5b-8 complex and MAC through its physical incorporation into the complex (82). CD55 is known as a complement decay-accelerating factor (DAF) that accelerates the decay of C3 and C5 convertases through rapid dissociation of the catalytic subunit C2a or Bb present on the cell surface. This dissociation prevents the formation of anaphylatoxins, opsonins, and MAC. In addition, CD55 can recognize the C4b and C3b fragments created during C4 or C3 activation (80,81,85). Thus, these CRPs can modulate complementary action and can be decisive in tumor progression (86,87).

Among the soluble CRPs, FH is a plasma glycoprotein that regulates AP by blocking the assembly of C3 convertase (C3Bb) or accelerating the decay of C3Bb through its interaction with C3b. Furthermore, this interaction allows the regulation of C5 convertase activation (88–92). FH-like 1 (FHL-1) is an FH isoform that can also regulate

AP in a manner similar to FH (93). In contrast to FH, properdin or complement factor P (CFP) is a positive AP regulator whose main role is to stabilize surface-bound C3 and C5 alternative pathway convertases and inhibit the FH-mediated cleavage of C3b by FI. The *CFP* gene is located on the X chromosome. *CFP* deficiency can seriously impair AP activation and increase susceptibility to infections (94).

CD59, CD55, AND CD46 OVEREXPRESSION IN CANCER

Head and neck cancer tumor cells feature high expression of mCRPs, such as CD46, CD55, and CD59 (79). Interestingly, in human ovarian cancer cells, IL-6 and IL-8 play important roles in the overexpression of CD55 and CD59 (95). Both have a pro-tumorigenic function in this type of cancer, with CD59 detected in up to 50% of tumors and in border areas of normal to malignant ovarian tissues (96). Their increased expression on cell membranes also occurs in the fluid phase in ovarian and uterine cancer (83) (**Fig. 5**). Moreover, stromal CD55 overexpression is an indicator of poor survival in colorectal cancer (81).

In addition to inhibiting the action of complement in the TME, CD59 can block the apoptosis of breast cancer cells, contributing to tumor development (82). Low expression of *CD59* mRNA favors patient survival in head and neck, cervical, pancreatic, and stomach cancers. In contrast, higher expression of *CD59* is associated with greater survival of renal cancer patients, highlighting the opposing roles of this regulator (27).

Increased CD46 expression is associated with worse overall and relapse-free survival of breast cancer patients (97). In addition, in breast and prostate cancers, the promoter of the *CD46* gene, which has two binding sites for STAT3, is induced by STAT3 and IL-6, and protects cancer cells from complement lysis, generating a protumor profile (98). However, *CD46* mRNA expression in cancer cells may result in different clinical outcomes (27). Low *CD46* expression has been associated with increased patient survival in cervical cancer, while the same outcome has been associated with higher *CD46* expression in stomach cancer patients (27). In stomach cancer, high CD46 expression seems to occur in both normal and tumor cells, probably due to the protective role of this regulator against the action of complement in the TME (27).

In conclusion, low expression of membrane-bound CRPs is generally associated with poor outcomes, but more investigations are still needed to understand their impact on the development and progression of different types of tumors.

NON-CANONICAL ROLE OF COMPLEMENT FH AND PROPERDIN IN CANCER

Higher *CFH* gene expression plays a pro-tumoral role in hepatocellular carcinoma cell lines and is associated with the upregulation of stemness factors in liver cancer (76). FH plays a role in the late SV40 factor (LSF-1) pathway and is associated with increased *LSF1* gene expression. Nuclear LSF-1 binds to the stemness factor promoters Nanog, Oct4, Sox2, and c-Myc, resulting in increased expression, tumor formation, and growth *in vivo* (76) (**Fig. 1**). Moreover, the increased expression of FH, especially in the nucleus of tumor cells, indicates that this molecule plays a role in liver cancer cells [76]. Likewise, in cSCC, FH and its isoform FHL-1 act on other intracellular pathways beyond the complement pathway, being negatively regulated by the inhibition of the ERK1/2, p38, and MAPK pathways. However, they are upregulated by IFN γ , IL-1b, TGF- α , TGF- β , and TNF- α . As expected, other complement components, including C1s, C1r, and iC3b, were also found to be overexpressed in cSCC, indicating that secreted components and complement activation probably occurred *in situ*. Moreover, higher expression of *CFH* mRNA is associated with lower survival in patients with renal cancer (27). In summary, the expression of FH and FHL-1 is specifically induced during cutaneous carcinogenesis, probably by blocking the complement and intracellular pathways (99).

Properdin acts as a novel tumor suppressor in breast cancer. High expression of intracellular properdin, both *in vitro* and *in vivo*, induces the transcription of testin LIM domain protein (TES), leading to increased expression of the pro-apoptotic transcription factor DDIT3 (DNA-damage-inducible transcript 3). Thus, increased properdin expression modulates cell apoptosis and plays an antitumor role in breast cancer (100). The antitumor role of properdin was corroborated by an *in vitro* study using bone marrow-derived macrophages from properdin-deficient mice, which stimulated the growth of melanoma cell lines. This properdin deficiency results in low levels of *IL1* mRNA and higher levels of *arginase-1*, *monocyte chemotactic protein-1*, and *IL10* mRNAs, suggesting that a properdin-deficient TME may induce an influx of M2 macrophages with pro-tumoral activity (101).

Although no significant relationship between properdin expression and cancer prognosis has been reported so far (27), this regulator has an important antitumor role (in non-canonical complement pathways) in breast cancer (27,101). In summary, FH has a pro-tumoral effect in HCC, while properdin suppresses breast and melanoma cancer tumors. These two CRPs may represent non-canonical complement pathways and play a key role in tumor formation and growth.

4. CONCLUDING REMARKS

Components of the CS are increasingly being recognized as potential biomarkers and therapeutic targets for various types of cancer. However, activation of non-canonical pathways of the CS is still poorly explored, both in homeostasis and cancer pathophysiology scenarios. Complement activation influences several tumor processes, including angiogenesis, invasion, metastasis, immunomodulation, and metabolic remodeling, thereby favoring the TME, proliferation, and altered cellular responses. Although regular activation of complement is evident in many of these instances, increasing evidence points to a role for complement components in various cellular events in the TME, independent of regular activation of CP, AP, and LP. In this scoping review, we compile extensive evidence on the anti- or pro-tumoral role of non-canonical complement pathways in various types of cancer, including breast, lung, liver, ovarian, stomach/gastric, renal, and prostate cancers. The complement components C1q, C3a-C3aR, C5a-C5aR, FH, and properdin play crucial roles in the intracellular pathways that control cell growth and proliferation. Specific pro- or anti-tumoral roles seem to depend on the type of tumor cell, except CRPs, C3a-C3aR, and C5a-C5aR, which are immunosuppressive and promote tumor growth in all types of cancers addressed in this review. Considering the relevance of CS in non-canonical complement pathways in different types of tumors, the knowledge gap highlighted in this scoping review needs to be addressed in future studies. Components of the CS have actions in cancer that go beyond the proteolytic cascade, with essential roles in intracellular pathways.

5. References

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**;144:646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
2. Bulla R, Tripodo C, Rami D, Ling GS, Agostinis C, Guarnotta C, *et al.* C1q acts in the tumour microenvironment as a cancer-promoting factor independently of complement activation. *Nat Commun* **2016**;7:10346. <https://doi.org/10.1038/ncomms10346>.
3. Zhang R, Liu Q, Li T, Liao Q, Zhao Y. Role of the complement system in the tumor microenvironment. *Cancer Cell Int* **2019**;19:300. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1027-3>.
4. Revel M, Daugan M, Sautés-Fridman C, Fridman W, Roumenina L. Complement system: promoter or suppressor of cancer progression?. *Antib* **2020**;9:57. <https://doi.org/10.3390/antib9040057>.

5. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **2021**;71:209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
6. World Health Organization. [cited 2022 May 26]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
7. International Agency for Research on Cancer. [cited 2022 May 26]. Available from: <https://www.iarc.who.int>.
8. Deo SVS, Sharma J, Kumar S. GLOBOCAN 2020 Report on global cancer burden: challenges and opportunities for surgical oncologists. *Ann Surg Oncol* **2022**;29:6497–500. <https://doi.org/10.1245/s10434-022-12151-6>.
9. Macaluso M, Paggi MG, Giordano A. Genetic and epigenetic alterations as hallmarks of the intricate road to cancer. *Oncog* **2003**;22:6472–8. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206955>.
- 10.
11. Pio R, Corrales L, Lambris JD. Tumor microenvironment and cellular stress. In: Koumenis C, Hammond E, Giaccia A, editors. *The Role of Complement in Tumor Growth*. New York: Springer; 2014. p. 772. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5915-6>.
- 12.
13. Flavahan WA, Gaskell E, Bernstein BE. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Sci* **2017**;357:eaal12380. <https://doi.org/10.1126/science.aal2380>.
14. Drak Alsibai K, Meseure D. Tumor microenvironment and noncoding RNAs as co-drivers of epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *Dev Dyn* **2017**;247:405–31. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24548>.
15. Wu P, Gao W, Su M, Nice EC, Zhang W, Lin J, *et al.* Adaptive mechanisms of tumor therapy resistance driven by tumor microenvironment. *Front Cell Dev Biol* **2021**;9:641469. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.641469>.
16. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncog* **2008**;27:5904–12. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.271>.
17. Barriga V, Kuol N, Nurgali K, Apostolopoulos V. The complex interaction between the tumor micro-environment and immune checkpoints in breast cancer. *Cancers* **2019**;11:1205. <https://doi.org/10.3390/cancers11081205>.
18. Giraldo NA, Sanchez-Salas R, Peske JD, Vano Y, Becht E, Petitprez F, *et al.* The clinical role of the TME in solid cancer. *Br J Cancer* **2019**;120:45–53. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0327-z>.
19. Petitprez F, Meylan M, de Reyniès A, Sautès-Fridman C, Fridman WH. The tumor microenvironment in the response to immune checkpoint blockade therapies. *Front Immunol* **2020**;11:784. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00784>.
20. Nunez-Cruz S, Gimotty PA, Guerra MW, Connolly DC, Wu YQ, DeAngelis RA, *et al.* Genetic and pharmacologic inhibition of complement impairs endothelial cell function and ablates ovarian cancer neovascularization. *Neoplas* **2012**;14:994–1004. <https://doi.org/10.1593/neo.121262>.

21. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* **2010**;20:34–50. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.139>.
22. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina L.T. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol* **2015**;6:262. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00262>.
23. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part II: role in immunity. *Front Immunol* **2015**;6:257. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00257>.
24. Andrade FA, Lidani KCF, Catarino SJ, Messias-Reason IJ. Serine proteases in the lectin pathway of the complement system. In: Chakraborti S, Dhalla NS, editors. *Proteases in Physiology and Pathology*. Singapore: Springer; 2017. p. 397–420. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2513-6_18.
25. Reis ES, Mastellos DC, Ricklin D, Mantovani A, Lambris JD. Complement in cancer: untangling an intricate relationship. *Nat Rev Immunol* **2018**;18:5–18. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.97>.
26. Ricklin D, Reis ES, Mastellos DC, Gros P, Lambris JD. Complement component C3 –The “swiss army knife” of innate immunity and host defense. *Immunol Rev* **2016**;274:33–58. <https://doi.org/10.1111/imr.12500>.
- 27.
28. Olcina MM, Kim RK, Melemenidis S, Graves EE, Giaccia AJ. The tumour microenvironment links complement system dysregulation and hypoxic signalling. *Br J Radiol* **2019**;92:1093. <https://doi.org/10.1259/bjr.20180069>.
29. Tricco AC, Lillie E, Zarin W, O'Brien KK, Colquhoun H, Levac D, *et al.* PRISMA extension for scoping reviews (PRISMA-ScR): checklist and explanation. *Ann Intern Med* **2018**;169:467–73. <https://doi.org/10.7326/M18-0850>.
30. The Human Protein Atlas. [cited 2022 May 26]. Available from: <https://www.proteinatlas.org>.
31. Lepow IH, Naff GB, Todd EW, Pensky J, Hmz F. Chromatographic resolution of the first component of human complement into three activities. *J Exp Med* **1963**;117:983–1008. doi:10.1084/jem.117.6.983.
32. Naff GB, Pensky J, Lepow IH. The macromolecular nature of the first component of human complement. *J Exp Med* **1964**;119:593–613. <https://doi.org/10.1084/jem.119.4.593>.
33. Reid KBM, Porter RR. Subunit composition and structure of subcomponent C1q of the first component of human complement. *Biochem J* **1976**;155:19–23. doi:10.1042/bj1550019.
34. Thielens NM, Tedesco F, Bohlson SS, Gaboriaud C, Tenner AJ. C1q: a fresh look upon an old molecule. *Mol Immunol* **2017**;89:73–83. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.05.025>.
35. Fraser DA, Bohlson SS, Jasinskiene N, Rawal N, Palmarini G, Ruiz S, *et al.* C1q and MBL, components of the innate immune system, influence monocyte cytokine expression. *J Leukoc Biol* **2006**;80:107–16. <https://doi.org/10.1189/jlb.1105683>.
36. Bohlson SS, O'Conner SD, Hulsebus HJ, Ho MM, Fraser DA. Complement, C1Q,

and C1q-related molecules regulate macrophage polarization. *Front Immunol* **2014**;5:402. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00402>.

37. Manderson AP, Botto M, Walport MJ. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Ann Rev Immunol* **2004**;22:431–56. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104549>.

38. Stegert M, Bock M, Trendelenburg M. Clinical presentation of human C1q deficiency: how much of a lupus?. *Mol Immunol* **2015**;67:3–11. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.007>.

39. Roumenina LT, Daugan MV, Noe R, Petitprez F, Vano YA, Sanchez-Salas R, *et al*. Tumor cells hijack macrophage-produced complement C1q to promote tumor growth. *Cancer Immunol Res* **2019**;7:1091–105. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0891>.

40. Lee C, Jeong H, Bae Y, Shin K, Kang S, Kim H, *et al*. Targeting of M2-like tumor-associated macrophages with a melittin-based pro-apoptotic peptide. *J Immunother Cancer* **2019**;7:147. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0610-4>.

41. Mangogna A, Agostinis C, Bonazza D, Belmonte B, Zacchi P, Zito G, *et al*. Is the complement protein C1q a pro- or anti-tumorigenic factor? Bioinformatics analysis involving human carcinomas. *Front Immunol* **2019**;10:865. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00865>.

42. Agostinis C, Videgar R, Belmonte B, Mangogna A, Amadio L, Geri P, *et al*. Complement protein C1q binds to hyaluronic acid in the malignant pleural mesothelioma microenvironment and promotes tumor growth. *Front Immunol* **2017**;8:1559. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01559>.

43.

44. Nishina H, Wada T, Katada T. Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J Biochem* **2004**;136:123–6. <https://doi.org/10.1093/jb/mvh117>.

45. Marampon F, Ciccarelli C, Zani BM. Biological rationale for targeting MEK/ERK pathways in anti-cancer therapy and to potentiate tumour responses to radiation. *Int J Mol Sci* **2019**;20:2530. <https://doi.org/10.3390/ijms20102530>.

46. Lee JH, Poudel B, Ki HH, Nepali S, Lee YM, Shin JS, *et al*. Complement C1q stimulates the progression of hepatocellular tumor through the activation of discoidin domain receptor 1. *Sci Rep* **2018**;8:4908. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23240-6>.

47. Hong Q, Sze CI, Lin SR, Lee MH, He RY, Schultz L, *et al*. Complement C1q activates tumor suppressor WWOX to induce apoptosis in prostate cancer cells. *PLoS One* **2009**;4:e5755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005755>.

48. Bandini S, Macagno M, Hysi A, Lanzardo S, Conti L, Bello A, *et al*. The non-inflammatory role of C1q during Her2/neu-driven mammary carcinogenesis. *Oncoimmunol* **2016**;5:e1253653. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1253653>.

49. Riihilä P, Viiklepp K, Nissinen L, Farshchian M, Kallajoki M, Kivisaari A, *et al*. Tumour-cell-derived complement components C1r and C1s promote growth of cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* **2020**;182:658–70. <https://doi.org/10.1111/bjd.18095>.

50. Coulthard LG, Woodruff TM. Is the complement activation product C3a a proinflammatory molecule? Re-evaluating the evidence and the Myth. *J Immunol* **2015**;194:3542–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403068>.

51. Jeon H, Han SR, Lee S, Park SJ, Kim JH, Yoo SM, *et al*. Activation of the complement

system in an osteosarcoma cell line promotes angiogenesis through enhanced production of growth factors. *Sci Rep* **2018**;8:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23851-z>.

52. Manning ML, Williams SA, Jelinek CA, Kostova MB, Denmeade SR. Proteolysis of complement factors iC3b and C5 by the serine protease prostate-specific antigen in prostatic fluid and seminal plasma. *J Immunol* **2013**;190:2567–74. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200856>.

53. Bandini S, Curcio C, Macagno M, Quagliano E, Arigoni M, Lanzardo S, *et al.* Early onset and enhanced growth of autochthonous mammary carcinomas in C3-deficient Her2/neu transgenic mice. *Oncoimmunol* **2013**;2:1–14. <https://doi.org/10.4161/onci.26137>.

54. Li Z, Li D, Tsun A, Li B. FOXP3+ regulatory T cells and their functional regulation. *Cell Mol Immunol* **2015**;12:558–65. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.10>.

55. Liszewski MK, Kolev M, Le Friec G, Leung M, Bertram PG, Fara AF, *et al.* Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunol* **2013**;39:1143–57. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.018>.

56. Kwak JW, Laskowski J, Li HY, McSharry MV, Sippel TR, Bullock BL, *et al.* Complement activation via a C3a receptor pathway alters CD4+ T lymphocytes and mediates lung cancer progression. *Cancer Res* **2018**;78:143–56. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0240>.

57. Yuan K, Ye J, Liu Z, Ren Y, He W, Xu J, *et al.* Complement C3 overexpression activates JAK2 / STAT3 pathway and correlates with gastric cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res* **2020**;39:1–15. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1514-3>.

58. Cho MS, Vasquez HG, Rupaimoole R, Pradeep S, Wu S, Zand B, *et al.* Autocrine effects of tumor-derived complement. *Cell Rep* **2014**;6:1085–95. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.014>.

59. Shu C, Zha H, Long H, Wang X, Yang F, Gao J, *et al.* C3a-C3aR signaling promotes breast cancer lung metastasis via modulating carcinoma associated fibroblasts. *J Exp Clin Cancer Res* **2020**;39:1–14. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1515-2>.

60. Afshar-Kharghan V. The role of the complement system in cancer. *J Clin Investig* **2017**;127:780–9. <https://doi.org/10.1172/JCI90962>.

61. Ward PA. Functions of C5a receptors. *J Mol Med* **2009**;87:375–8. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0442-7>.

62. Corrales L, Ajona D, Rafail S, Lasarte JJ, Riezu-Boj JI, Lambris JD, *et al.* Anaphylatoxin C5a creates a favorable microenvironment for lung cancer progression. *J Immunol* **2012**;189:4674–83. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201654>.

63. Gunn L, Ding C, Liu M, Ma Y, Qi C, Cai Y, *et al.* Opposing roles for complement component C5a in tumor progression and the tumor microenvironment. *J Immunol* **2012**;189:2985–94. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200846>.

64. Nitta H, Murakami Y, Wada Y, Eto M, Baba H, Imamura T. Cancer cells release anaphylatoxin C5a from C5 by serine protease to enhance invasiveness. *Oncol Rep* **2014**;32:1715–9. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3341>.

65. Lu Y, Hu XB. C5a stimulates the proliferation of breast cancer cells via Akt-dependent RGC-32 gene activation. *Oncol Rep* **2014**;32:2817–23.

<https://doi.org/10.3892/or.2014.3489>.

66. Vadrevu SK, Chintala NK, Sharma SK, Sharma P, Cleveland C, Riediger L, *et al*. Complement C5a receptor facilitates cancer metastasis by altering t-cell responses in the metastatic niche. *Cancer Res* **2014**;74:3454–65. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0157>.
67. Chen J, Li GQ, Zhang L, Tang M, Cao X, Xu GL, *et al*. Complement C5a/C5aR pathway potentiates the pathogenesis of gastric cancer by down-regulating p21 expression. *Cancer Lett* **2018**;412:30–6. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.10.003>.
68. Kaida T, Nitta H, Kitano Y, Yamamura K, Arima K, Izumi D, *et al*. C5a receptor (CD88) promotes motility and invasiveness of gastric cancer by activating RhoA. *Oncotarget* **2016**;7:84798-809. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12656>.
69. Maeda Y, Kawano Y, Wada Y, Yatsuda J, Motoshima T, Murakami Y, *et al*. C5aR is frequently expressed in metastatic renal cell carcinoma and plays a crucial role in cell invasion via the ERK and PI3 kinase pathways. *Oncol Rep* **2015**;33:1844–50. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3800>.
70. Xi W, Liu L, Wang J, Xia Y, Bai Q, Xiong Y, *et al*. Enrichment of C5a-C5aR axis predicts poor postoperative prognosis of patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* **2016**;7:80925-34. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13108>.
71. Saito K, Iioka H, Maruyama S, Sumardika IW, Sakaguchi M, Kondo E. PODXL1 promotes metastasis of the pancreatic ductal adenocarcinoma by activating the C5aR/C5a axis from the tumor microenvironment. *Neoplas* **2019**;21:1121–32. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2019.09.003>.
72. Nabizadeh JA, Manthey HD, Panagides N, Steyn FJ, Lee JD, Li XX, *et al*. C5a receptors C5aR1 and C5aR2 mediate opposing pathologies in a mouse model of melanoma. *FASEB J* **2019**;33:11060–71. <https://doi.org/10.1096/fj.201800980RR>.
73. Vlaicu SI, Tatomir A, Rus V, Rus H. Role of C5b-9 and RGC-32 in cancer. *Front Immunol* **2019**;10:1054. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01054>.
74. Morgan BP. The membrane attack complex as an inflammatory trigger. *Immunobiol* **2016**;221:747–51. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.04.006>.
75. Fishelson Z, Kirschfink M. Complement C5b-9 and cancer: mechanisms of cell damage, cancer counteractions, and approaches for intervention. *Front Immunol* **2019**;10:752. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00752>.
76. Triantafilou K, Hughes TR, Triantafilou M, Morgan PP. The complement membrane attack complex triggers intracellular Ca²⁺ fluxes leading to NLRP3 inflammasome activation. *J Cell Sci* **2013**;126:2903–13. <https://doi.org/10.1242/JCS.124388>.
77. Towner LD, Wheat RA, Hughes TR, Paul Morgan B. Complement membrane attack and tumorigenesis a systems biology approach. *J Biol Chem* **2016**;291:14927–38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.708446>.
78. Tegla CA, Cudrici C, Patel S, Trippe R, Rus V, Niculescu F, *et al*. Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes. *Immunol Res* **2011**;51:45–60. <https://doi.org/10.1007/s12026-011-8239-5>.
79. Wong EKS, Kavanagh D. Diseases of complement dysregulation—an overview.

Semin Immunopathol **2018**;40:49–64. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0663-8>.

80. Seol HS, Lee SE, Song JS, Rhee JK, Singh SR, Chang S, *et al.* Complement proteins C7 and CFH control the stemness of liver cancer cells via LSF-1. *Cancer Lett* **2016**;372:24–35. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.12.005>.
81. Ying L, Zhang F, Pan X, Chen K, Zhang N, Jin J, *et al.* Complement component 7 (C7), a potential tumor suppressor, is correlated with tumor progression and prognosis. *Oncotarget* **2016**;7:86536–46. doi: 10.18632/oncotarget.
82. Montalvo-Castro RE, Salinas-Jazmín N. Relationship between the expression of complement inhibitory proteins and therapeutic efficacy of antibodies in breast cancer. *Gac Med Mex* **2022**;158:141–9. <https://doi.org/10.24875/GMM.M22000657>.
83. Kesselring R, Thiel A, Pries R, Fichtner-Feigl S, Brunner S, Seidel P, *et al.* The complement receptors CD46, CD55 and CD59 are regulated by the tumour microenvironment of head and neck cancer to facilitate escape of complement attack. *Eur J Cancer* **2014**;50:2152–61. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.05.005>.
84. Geller A, Yan J. The role of membrane bound complement regulatory proteins in tumor development and cancer immunotherapy. *Front Immunol* **2019**;10:1074. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01074>.
85. Baek TH, Kim JH, Park MJ, Lee HK, Son HJ, Soon HK, *et al.* The stromal overexpression of decay accelerating factor (DAF/CD55) correlates with poor clinical outcome in colorectal cancer patients. *Korean J Pathol* **2011**;45:445–54. <https://doi.org/10.4132/KoreanJPathol.2011.45.5.445>.
86. Li B, Chu X, Gao M, Xu Y. The effects of CD59 gene as a target gene on breast cancer cells. *Cell Immunol* **2011**;272:61–70. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.09.006>.
87. Kapka-Skrzypczak L, Wolinska E, Szparecki G, Wilczynski GM, Czajka M, Skrzypczak M. CD55, CD59, factor H and factor H-like 1 gene expression analysis in tumors of the ovary and corpus uteri origin. *Immunol Lett* **2015**;167:67–71. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.06.017>.
88. Zhang R, Liu Q, Peng J, Wang M, Gao X, Liao Q, *et al.* Pancreatic cancer-educated macrophages protect cancer cells from complement-dependent cytotoxicity by up-regulation of CD59. *Cell Death and Dis* **2019**;10:836. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2065-4>.
89. Nicholson-Weller A, Wang C. Structure and function of decay accelerating factor CD55. *J Lab Clin Med* **1994**;123:485–91. PMID: 7511675.
90. Song Q, Zhang Z, Liu Y, Han S, Zhang X. The tag SNP rs10746463 in decay-accelerating factor is associated with the susceptibility to gastric cancer. *Mol Immunol* **2015**;63:473–8. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.10.006>.
91. Riihilä P, Nissinen L, Farshchian M, Kallajoki M, Kivisaari A, Meri S, *et al.* Complement component C3 and complement factor B promote growth of cutaneous squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* **2017**;187:1186–97. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.01.006>.
92. Rodriguez S, Cordoba DE, Lublin DM, Rubinstein P, Atkinson JP. Human genes for three complement components that regulate the activation of c3 are tightly linked. *J Exp Med* **1985**;161:1189–95. doi:10.1084/jem.161.5.1189.

93. Vik DP, Muñoz-Cánoves P, Chaplin DD, Tack BF. Factor H. In: Lambris JD, editor. *The Third Component of Complement, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin: Springer; 1990. p. 147–62. https://doi.org/10.1007/978-3-642-74977-3_8.
94. Blaum BS, Hannan JP, Herbert AP, Kavanagh D, Uhrin D, Stehle T. Structural basis for sialic acid-mediated self-recognition by complement factor H. *Nat Chem Biol* **2015**;11:77–82. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1696>.
91. Józsi M. Factor H family proteins in complement evasion of microorganisms. *Front Immunol* **2017**;8:571. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00571>.
92. Parente R, Clark SJ, Inforzato A, Day AJ. Complement factor H in host defense and immune evasion. *Cell Mol Life Sci* **2017**;74:1605–24. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2418-4>.
93. Dopler A, Guntau L, Harder MJ, Palmer A, Höchsmann B, Schrezenmeier H, *et al*. Selfversus nonself discrimination by the soluble complement regulators factor H and FHL-1. *J Immunol* **2019**;202:2082–94. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801545>.
94. Ferreira VP. Properdin. In: Barnum S, Schein T, editors. *The Complement FactsBook*, Second Edition. London: Elsevier; 2018. p. 283–93. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810420-0.00027-4>.
95. Kapka-Skrzypczak L, Popek S, Sawicki K, Wolińska E, Czajka M, Skrzypczak M. Effect of IL-6 and IL-8 on the expression of the complement activation inhibitors MAC-inhibitory protein and decay-accelerating factor in ovarian cancer A2780 cells. *Oncol Lett* **2016**;12:1507–12. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4795>.
96. Kapka-Skrzypczak L, Wolinska E, Szparecki G, Czajka M, Skrzypczak M. The immunohistochemical analysis of membrane-bound CD55, CD59 and fluid-phase FH and FH-like complement inhibitors in cancers of ovary and corpus uteri origin. *Cent Eur J Immunol* **2015**;40:349–53. <https://doi.org/10.5114/ceji.2015.54598>.
97. Maciejczyk A, Szelachowska J, Szynglarewicz B, Szulc R, Szulc A, Wysocka T, *et al*. CD46 expression is an unfavorable prognostic factor in breast cancer cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **2011**;19:540–6. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31821a0be9>.
98. Buettner R, Huang M, Gritsko T, Karras J, Enkemann S, Mesa T, *et al*. Activated signal transducers and activators of transcription 3 signaling induces CD46 expression and protects human cancer cells from complement-dependent cytotoxicity. *Mol Cancer Res* **2007**;5:823–32. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0352>.
99. Riihilä PM, Nissinen LM, Ala-Aho R, Kallajoki M, Grénman R, Meri S, *et al*. Complement factor H: a biomarker for progression of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* **2014**;134:498–506. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.346>.
100. Block I, Müller C, Sdogati D, Pedersen H, List M, Jaskot AM, *et al*. CFP suppresses breast cancer cell growth by TES-mediated upregulation of the transcription factor DDIT3. *Oncog* **2019**;38:4560–73. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0739-0>.
101. Al-Rayahi IAM, Browning MJ, Stover C. Tumour cell conditioned medium reveals greater M2 skewing of macrophages in the absence of properdin. *Immun Inflamm Dis* **2017**;5:68–77. <https://doi.org/10.1002/iid3.142>.

Supplementary files can be accessed via the respective links:

- Supplementary Table 1:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1KfgrwI5mxW8rkHU5YUTwNM0zXiAJ83sb/edit?usp=share_link&oid=114820676718315936485&rt=pof=true&sd=true

- Supplementary Table 2:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1KfgrwI5mxW8rkHU5YUTwNM0zXiAJ83sb/edit?usp=share_link&oid=114820676718315936485&rt=pof=true&sd=true

- Supplementary Figure 1 – C1q component:

https://drive.google.com/file/d/11ogigN_BBCZxsmHgjrLrHXHVG0yvfpqS/view?usp=share_link

- Supplementary Figure 2 – C3 :

https://drive.google.com/file/d/1dh84aPQThcq6lysHdrg8eyBTRY4LvWZc/view?usp=share_link

- Supplementary Figure 3 – C5:

https://drive.google.com/file/d/19qE9amGR6WJWpiZmSkWcIVDjz6N6uR5N/view?usp=share_link

- Supplementary Figure 4 – C7:

https://drive.google.com/file/d/1PpHVM5a4rubegYBP3iebjTZ-9wXTUJTn/view?usp=share_link

- Supplementary Figure 5 – Components regulators:

https://drive.google.com/file/d/1z_LRhPXJAY8zpBp3OdZGJAgBUHv52-aL/view?usp=share_link