

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
INSTITUTO DE PESQUISA EM ONCOLOGIA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA SAÚDE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS EM PACIENTES
COM NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL DE ALTO GRAU
TRATADOS COM INTERFERON PEGUILADO 2-B**

MARCO AURÉLIO TROVÓ

**UBERABA – MG
2017**

MARCO AURÉLIO TROVÓ

**DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS EM PACIENTES
COM NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL GRAU II E III
TRATADOS COM INTERFERON PEGUILADO 2-B**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Humana, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Antoniazi Michelin

UBERABA-MG
2017

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, aos meus pais e a minha família e sem sombra de dúvidas aos meus professores e aos meus colegas que tanto contribuíram para conclusão desta etapa da vida.

AGRADECIMENTOS

À Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia, juntamente com todo seu corpo docente, médicos, residentes e outros funcionários.

Ao Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta, pelo constante incentivo, amizade, ensinamentos e orientação deste trabalho.

À Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin minha coorientadora deste trabalho, pela atenção, orientação e apoio durante a realização deste trabalho.

À Profª. Dra. Ana Cristina Barcelos pela dedicação e ensinamentos durante o período de coletas das amostras e por encaminhar as pacientes do ambulatório de Colposcopia triadas para participação neste estudo.

Às secretárias Nilva Aparecida da Silva Aveiro, Zelma Rocha Camargos Pereira e Dóris Lima Dayrell de Carvalho pela colaboração nos ambulatórios.

Aos meus familiares: Luciana (esposa), Julia (filha) e Letícia (filha) pelo constante apoio durante a minha vida acadêmica e na pós-graduação.

Ao mestre André Adriano Rocha Aleixo pelos ensinamentos, companheirismo e compreensão.

A todos os amigos e colegas do Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) que me ajudaram direta ou indiretamente na realização desse estudo, em especial aos colegas de Pós-Graduação: Eduardo Arthur Rodovalho Alves, Fabiano Mundin e Letícia pelos conhecimentos e ensinamentos.

A todas as pacientes que voluntariamente participaram deste projeto pela confiança e compromisso possibilitando o desenvolvimento científico, meus sinceros e especiais agradecimentos

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A imunoterapia em pacientes com câncer é um tratamento muito promissor e o desenvolvimento de novos protocolos e o estudo dos mecanismos de regressão é uma realidade. Os interferons (IFNs) são glicoproteínas pertencentes à família das citocinas que por sua vez desempenham importante ação antiviral, antitumoral, imunomoduladora e atividades antiangiogênicas. Objetivo é traçar os perfis imunológicos Th1 e Th2 envolvidos em lesões cervicais de alto grau NIC II/NIC III por dosagem sérica de citocinas pelo método de Elisa em amostras de soro colhidos durante o tratamento por 6 semanas com IFN Peguilado 2-b administrado por via subcutânea. O perfil de resposta das pacientes foram analisadas em três intervalos de coleta sanguínea e avaliadas as citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-12, TGF-beta, IL-12. Os grupos de análise foram divididos em boa e má resposta e comparados utilizando-se a mediana por Mann-Whitney test, Wilcoxon Matched Paires test e Kruskal-Wallis test pelo software GraphPad Prism 6[®], e os valores de p menores que 0,05 ($p < 0.05$) foram considerados estatisticamente significantes. Os resultados mostram que no grupo que houve regressão os pacientes apresentaram um aumento na quantidade de IFN- γ durante toda a imunoterapia, com significância estatística $p = 0,0123$. Por outro lado, também mostrou um aumento da IL-6, IL-10 e TGF (perfil Th2) no grupo sem resposta. Amostra geral ($n = 17$), houve uma regressão de 47% das lesões de alto grau. Concluimos que a regressão das lesões cervicais depende do perfil imunológico de cada paciente como também as mudanças nas respostas imune para um perfil Th1.

Palavras-chave: Imunoterapia, neoplasia intraepitelial cervical, interleucinas.

ABSTRACT

Immunotherapy in cancer patients is a very promising treatment and the development of new protocols and the study of the mechanisms of regression is a reality. Interferons (IFNs) are glycoproteins that belong to the family of cytokines, which have an important antiviral, antitumor, immunomodulatory and antiangiogenic activities. The objective of this study was to determine which immunological profile (Th1 or Th2) could be involved in high-grade cervical lesions (CIN II / CIN III) through the serial dosing of cytokines by the Elisa method collected from peripheral blood samples in patients during a six weekly treatment with subcutaneously administered Pegylate 2-b IFN. The profile of the responses were analyzed in three blood samples and the cytokines of IL-1 β , IL-2, IL-4, TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-12, TGF-beta , IL-12. The analyzed groups were divided into good and bad response and were compared using non-parametric methods using the Mann-Whitney test, Wilcoxon Matched Paires test and Kruskal-Wallis test by GraphPad Prism 6@ software, and the values observed for significance with P less than 0.05 ($p < 0.05$). The results show that in the regression group the patients presented a increase in the amount of IFN- γ during the entire immunotherapy, with statistical significance $p=0,0123$. On the other side, also showed an increase of IL-6, IL-10 and TGF (Th2 profile) in the group without a responde. In the general sample ($n = 17$), there was a 47% regression of high-grade lesions. Concluded that the regression of the lesions depends on the immunological profile of each patient as well as the change in the immune response to a Th1 profile.

Keywords: Immunotherapy, cervical intraepithelial neoplasia, interleukins.

LISTA DE ABREVIATURAS

HPV – Papilomavírus humano

WHO – World Health Organization

INCA – Instituto Nacional do Câncer

NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical

NIC I - Neoplasia intra-epitelial cervical grau I

NIC II - Neoplasia intra-epitelial cervical grau II

NIC III - Neoplasia intra-epitelial cervical grau III

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

TBS – The Bethesda System

LSIL – Lesão Intraepitelial de Baixo Grau

HSIL – Lesão Intraepitelial de Alto Grau

S.I – Sistema Imune

IFN-TI – Interferons do Tipo I

IFN-TII – Interferons do Tipo II

IFN-TIII – Interferons do Tipo III

MHC/CHP – Complexo Principal de Histocompatibilidade

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

CD4 – Linfócitos T Auxiliares

CD8 – Linfócitos T Citolíticos

Th1 – Subtipo de Linfócito Auxiliar do Perfil 1

Th2 – Subtipo de Linfócito Auxiliar do Perfil 2

Treg - Células T regulatórias

UFTM - Universidade Federal do Triângulo Mineiro

HE - Hospital Escola

IL – Interleucina

IL-2: Interleucina-2

IL-4: Interleucina-4

IL-10: Interleucina-10

IL-12: Interleucina-12

TNF – Fator de Necrose Tumoral

IFN- γ – Interferon Gama

NK – Células Natural Killer

NKT – Células Natural Killer expressando receptor de Célula T

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

CAF – Cirurgia de alta frequência

LEEP – Procedimento de excisão eletrocirúrgica

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	1
1.1 – O câncer de colo uterino.....	1
1.2 - História Natural da doença.....	1
1.3 - Rastreamento do Câncer de colo de útero.....	2
1.4 - Aspectos Epidemiológicos.....	3
1.5 - Papiloma Vírus Humano HPV.....	5
1.6- Neoplasia Intraepitelial Cervical.....	8
1.7 –Resposta Imune ao Papiloma Vírus.....	11
1.7.1- A Imunidade Inata e HPV.....	12
1.7.2- Resposta Humoral e HPV.....	12
1.7.3- Resposta Imune Adaptativa e HPV.....	12
1.7.4- Citocinas e Perfil de Resposta Imune (Th1 / Th2) e HPV.....	13
1.8- Citocinas.....	14
1.9- Mecanismos Que Ligam À Inflamação Ao Câncer.....	17
1.10- Interferon.....	17
1.11- Tratamento e Imunoterapias.....	19
2-JUSTIFICATIVA	20
3-OBJETIVOS	21
4-PACIENTES&MÉTODOS:	21
4.1- Casuística.....	21
4.2- Aplicação do Interferon.....	23
4.3- Colposcopia.....	24
4.3.1- Imagens Colposcópicas (2014-16).....	25
4.4- Anátomo Patológico.....	28
4.5- Dados Clínicos.....	28
4.6- Coleta de Sangue Periférico.....	28
4.7- Metodologia.....	28
4.7.1- Elisa.....	28
4.8- Análise Estatística.....	29
5-RESULTADOS	31
5.1 – Direcionamento do Estudo.....	31
5.2 – Análise das Concentrações Séricas das Interleucinas.....	34
6-DISCUSSÃO	47
7-CONCLUSÕES	54
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55-62

9-ANEXOS	63
ANEXO 1 – TERMO DE ESCLARECIMENTO.....	63
ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE.....	65
ANEXO 3 – PROTOCOLO DO INTERFERON.....	66
ANEXO 4 – CONCENTRAÇÃO DE CADA CITOCINA.....	68-71

LISTA DE FIGURAS

Figura.1: Organização genômica do vírus do papiloma humano. Fonte: (PRENDIVILLE, W.; DAVIES, 2004).

Figura 2: Alterações nos padrões de expressão que acompanham a progressão para o câncer cervical Figura 2: Fonte: (JOHN DOORBAR, 2006) adaptado.

Figura 3: A progressão da infecção do HPV até o câncer do colo do útero. Fonte: (SHULZHENKO, 2014).

Figura 4: Perfil das citocinas.

Figura 5: Citocinas relacionadas com a Neoplasia Intraepitelial Cervical e Infecção pelo HPV Fonte: (LINSINGEN, 2008) adaptado.

Figura 6: Descrição das etapas do procedimento.

Figura 7: Distribuição dos Pacientes conforme a lesão inicial.

Figura 8: Representa a proporção de pacientes com boa e má resposta.

Figura 9: Representa a proporção de procedimentos realizados ao final do tratamento com as pacientes que persistiram com a lesão de alto grau tanto NIC II quanto NICIII.

Figura 10: Representa a evolução diagnóstico do início ao final do tratamento.

Figura 11: Imagem colposcópica de pacientes com Boa Resposta.

Figura 12: Imagem colposcópica de pacientes com Boa Resposta.

Figura 13: Imagem colposcópica de pacientes com Má Resposta.

Figura 14: Imagem colposcópica de pacientes com Má Resposta.

LISTA DE FIGURAS (ANÁLISE ESTATÍSTICA).

Figura 15: A) Concentração Sérica da IL-10 Amostra Geral O gráfico representa, de uma forma geral, a variação da concentração da interleucina IL-10 nas amostras séricas colhidas de todos os pacientes em um total de 3 amostras durante o tratamento com IFN 2b Peguilado.

Figura16: A') Concentração Sérica da IL-10 Amostra Geral O gráfico representa, de uma forma geral, o aumento da concentração da interleucina IL-10, observado sobretudo entre 1 e a 2 amostras $p=0,0313$.

Figura17: Concentração Sérica da IL-10 Boa e Má Resposta. Analisa a concentração da IL-10 em dois grupos, Boa (**B**) e Má Resposta (**C**) ao uso de IFN. Em ambos, com análise com Kruskal-Wallis test, sem significância estatística.

Figura18: A) Concentração Sérica da IL-4 Amostra Geral. Analisa a concentração da IL-4 durante as aplicações de IFN peguilado 2b por seis semanas, através da coleta do soro 1^a, 2^a e 3^a amostras. Não houve significância estatística.

Figura 19: Concentração Sérica da IL-4 Boa e Má Resposta. Concentração da IL-4 em dois grupos, **B**, **C** e **D** ao uso de IFN. Em ambos, com análise com Kruskal-Wallis test sem significância estatística.

Figura 20: Concentração Sérica da IL-8 Amostra Geral. Concentração da IL-8 entre as pacientes tratadas com IFN 2b Peguilado, nas 3 amostras colhidas do soro durante as 6 aplicações. Na Amostra Geral sem significância estatística.

Figura 21: Concentração Sérica da IL-8 Boa e Má Resposta. Analisa a concentração da IL-8 em dois grupos, **B**, **C** e **D** ao uso de IFN. Em ambos, com análise (Kruskal-Wallis test) sem significância estatística.

Figura22: Concentração Sérica da IL-2 Amostra Geral. As concentrações da IL-2 entre as pacientes tratadas com IFN 2b Peguilado, nas 3 amostras colhidas do soro durante as 6 aplicações.

Figura 23: Concentração Sérica da IL-2 Boa e Má Resposta. Analisa a concentração da IL-2 em três grupos, **B**, **C** e **D** ao uso de IFN. Em ambos, com análise Kruskal-Wallis test sem significância estatística.

Figura 24: Concentração Sérica da IL-1_β Amostra Geral. As concentrações da IL-1_β entre as pacientes tratadas com IFN 2b Peguilado, nas 3 amostras colhidas de sangue periférico durante as 6 aplicações.

Figura 25: Concentração Sérica da IL-1_β Boa e Má Resposta. A concentração da IL-1_β em três grupos, **B**, **C** e **D** ao uso de IFN. Em ambos, com análise Kruskal-Wallis test sem significância estatística.

Figura 26: Concentração Sérica da IL-6 Amostra Geral. Concentração da IL-6 entre as pacientes tratadas com IFN 2b Peguilado, nas 3 amostras colhidas do soro durante as 6 aplicações. Significância estatística na amostra geral com $p=0,0241$.

Figura 27: Concentração Sérica da IL-6 Boa e Má Resposta. Concentração de IL-6 em três grupos, **B**, **C** e **D** ao uso de IFN. Nas pacientes do grupo **C** houve significância estatística, fato também encontrado ao analisar grupo **D**.

Figura 28: Média e Tendência do IFN da IL-6 Má Resposta. Gráfico das médias e tendências da IL-6. Verifica-se um aumento da concentração.

Figura 29: Concentração Sérica da IL-12 Amostra Geral. Concentração da IL-12 entre as pacientes tratadas com IFN 2b Peguilado, nas 3 amostras colhidas do soro durante as 6 aplicações.

Figura 30: Concentração Sérica da IL-12 Boa e Má Resposta. Concentração da IL-12 em três grupos, **B**, **C** e **D** ao uso de IFN. Em ambos, com análise Kruskal-Wallis test sem significância estatística.

Figura 31: Concentração Sérica da IFN Amostra Geral. Concentração do IFN nas amostras colhidas de todos os pacientes tratadas com IFN 2b Peguilado, nas 3 amostras colhidas do soro durante as 6 aplicações. Com significância estatística.

Figura 32: Média e Tendência do IFN na Amostra Geral. Média e Tendência do IFN na Amostra Geral. Verifica-se aumento da concentração da 2^a (60,9429 pg/ml) com a 3^a (149,049 pg/ml) amostra $p=0,0046$.

Figura 33: Concentração Sérica da IFN Boa e Má Resposta. Concentração de IFN em três grupos, **B**, **C** e **D** com uso de IFN com significância estatística $p=0,0475$.

Figura 34: Média e Tendência do IFN Boa Resposta. Média e Tendência do IFN Boa Resposta. Verifica-se aumento da concentração da 2^a (51,6744 pg/ml) para a 3^a (114,949 pg/ml) amostra com significância $p=0,0278$ Mann Whitney test.

Figura 35: Concentração Sérica da TNF Amostra Geral. Concentração de TNF entre as pacientes tratadas com IFN 2b Peguilado, nas 3 amostras colhidas do soro durante as 6 aplicações.

Figura 36: Concentração Sérica da TNF Boa e Má Resposta. Concentração de TNF em três grupos, **B**, **C** e **D** ao uso de IFN. Em ambos, com análise Kruskal-Wallis test sem significância estatística.

Figura 37: Concentração Sérica da TGF Amostra Geral. Concentração de TGF entre as pacientes tratadas com IFN 2b Peguilado, nas 3 amostras colhidas do soro durante as 6 aplicações.

Figura 38: Média e Tendência do IFN na Amostra Geral. Média e Tendência do TGF na Amostra Geral. Verifica-se aumento da concentração da 1^a (695.495 pg/ml), 2^a (1033.42) até 3^a (1414,23 pg/ml).

Figura 39: Concentração Sérica da TGF Boa e Má Resposta. Concentração do TGF em cada grupo, **B**, **C** e **D** com aplicação semanal do IFN 2b Peguilado

Figura 40: Média e Tendência do TGF Má Resposta. Média e Tendência do TGF na Má Resposta. Verifica-se aumento da concentração da 1^a (953,407), 2^a (1.003,77 pg/ml) até 3^a (162,696 pg/ml) amostra com $p=0,2054$.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de HPV segundo o nível de evidência sobre a carcinogenicidade do colo uterino. Fonte: (Bouvard, 2009)

Tabela 2 - Analogia entre as nomenclaturas citopatológicas e histopatológicas das lesões cervicais. Fonte: INCA, 2011.

Tabela 3 - Diagnóstico e número de pacientes selecionadas para o estudo.

Tabela 4 - Diagnóstico Inicial e Final por biópsia de todas as pacientes e conduta tomada em cada caso, após o término do tratamento.

Tabela 5 - Relação das pacientes selecionadas do Grupo Boa Resposta.

Tabela 6 - Relação das pacientes selecionadas do Grupo Má Resposta.

1- INTRODUÇÃO:

1.1- O CÂNCER DE COLO DE ÚTERO

O câncer de colo uterino é uma das maiores causas de morte no mundo. Publicações (WHO, 2015), apontam o câncer de colo uterino como o terceiro mais comum dos tipos de câncer entre as mulheres, e o segundo de maior prevalência sendo considerado hoje um problema de saúde pública em todo mundo.

O câncer de colo uterino caracteriza-se pela replicação desordenada do epitélio de revestimento do órgão, com conseqüente comprometimento do tecido subjacente, o estroma, e possível invasão de estruturas e órgãos próximos ou a distância. Trata-se de uma doença de desenvolvimento lento, com fase inicial assintomática com quadros de sangramento vaginal intermitente ou após a relação sexual, secreção vaginal anormal e dor abdominal associada com queixas urinárias ou intestinais nos casos mais avançados da doença (INCA, 2010).

1.2 - HISTÓRIA NATURAL DA DOENÇA

Os primeiros conhecimentos sobre a história natural e patogênese envolvendo as etapas pré-invasivas do câncer de colo de útero iniciaram-se em 1943, com os primeiros esfregaços citológicos vaginais colhidos por George Papanicolaou que apartir de então definiu-se a classificação citooncológica. Observou-se que a história natural da doença compreendia a infecção pelo HPV, que acometia jovens no início da atividade sexual e que aparentemente se comportaria como fenômeno transitório. Entretanto, a persistência do vírus poderia propiciar alterações no epitélio cervical e a evolução para a transformação maligna. As infecções persistentes por tipos virais de alto risco do HPV demonstram a relação com o desenvolvimento do câncer de colo do útero (RICHARDSNO, H.; FRANCO, E.; PINTOS, J.; BERGERON, J .; ARELLA, M.; TELLIER, 2000).

Geralmente, essas lesões precursoras progridem lentamente por anos, antes de atingir o estágio invasor da doença, quando a cura se torna mais difícil e alguns casos impossível. A maioria das lesões do tipo Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau I (NIC

I), que representam apenas a manifestação da infecção pelo HPV, regridem em períodos entre 12 a 24 meses em 85-90 % dos casos, porém, quando não regridem, progridem para lesões de alto grau, como NIC II ou NIC III (INCA, 2010).

Hoje, considera-se o HPV (Papiloma Vírus Humano) como uma das principais causas de Neoplasia Maligna da região anogenital sobretudo de colo de útero além de ser encontrado em lesões verrucosas cutâneas, condilomas e epidermodisplasia. (D. Souza et. al. 2007) sugere que o HPV esteja intimamente implicado em uma parcela importante de casos de câncer de vagina, vulva, ânus, pênis além da mucosa oral, orofaringe e laringe.

Seguindo esse raciocínio, viu-se nos últimos anos, cientistas estudando a associação entre o câncer cervical e infecção por papiloma vírus humano (HPV) em biópsias realizadas em câncer cervical, sendo encontradas cerca de 90% DNA viral de HPV. Observou-se também que certas proteínas virais de HPV interferem com a transmissão de proteínas e genes relacionados com a resposta imunitária, tais como E6 e E7, tais como síntese de interleucinas favorecendo a evolução das lesões (MICHELIN et al., 2015a).

Sabe-se que o HPV 16 e HPV 18 são os dois tipos sorológicos de HPV altamente carcinogênicos, sendo responsáveis por 70% do câncer cervical e aproximadamente 50% da neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (SMITH, ET. AL., 2007); em contraste, HPV 6 e HPV 11 são responsáveis por aproximadamente 90% das verrugas genitais (Schiffman, M. Et. Al., 2007).

Em relação aos tipo histológico do câncer de colo útero, aproximadamente 80% são carcinoma de células escamosas (SCC), 10 a 15% constitui um adenocarcinoma (ADC), 3% carcinoma adenoescamoso (ADSC) e 1 a 2% o carcinoma neuroendócrino (BASKARAN et al., 2015).

1.3- RASTREAMENTO DO CÂNCER DE COLO DE ÚTERO

O rastreamento do câncer do colo do útero no Brasil, recomendado pelo Ministério da Saúde, é feito pelo exame citopatológico em mulheres de 25 a 64 anos. A

rotina é a repetição do exame Papanicolau a cada três anos, após dois exames normais consecutivos realizados com um intervalo de um ano. A efetividade do programa de controle do câncer do colo do útero depende da organização, da integralidade e da qualidade dos serviços, bem como do tratamento e do seguimento das pacientes. Para isso, o Ministério da Saúde disponibiliza de mecanismos de notificação nacional através do cadastro nacional (SISCOLO). Sabe-se que esse tumor apresenta alto potencial de prevenção e cura quando diagnosticado precocemente (INCA, 2016).

O rastreio das lesões precursoras do câncer do colo uterino dar-se-á por meio da realização da colpocitologia oncótica. A colheta deverá ser realizada com a espátula de Ayre e a escova “*Cito-Brush*”, e o material deverá conter células da zona de transformação.

De acordo com estudo de metanálise realizado por Fahey, Irwig, Macashill (1995), a média da especificidade encontrada para a citologia oncótica foi de 98% e a da sensibilidade de 51%. Portanto, de acordo com este estudo, deixa-se de diagnosticar metade das lesões, fato que precisaria ser profundamente analisado na busca da melhoria da eficácia do método. Também, Cohn & Herzog (2001), em rigorosas revisões, relatam índices de sensibilidade da ordem de parcos 51 a 58%. Outras técnicas menos invasivas têm sido desenvolvidas para a triagem rápida de câncer de colo do útero. Essas técnicas incluem inspeção visual com ácido acético e inspeção visual com solução de Lugol (colposcopia) (Idowu et.al., 2016).

Após o rastreamento e diagnóstico, atualmente o tratamento convencional das lesões de alto grau constitui-se no método ablativo excisional (laser) ou conização. No entanto, vários estudos têm indicado que as mulheres que tiveram estes procedimentos têm algumas complicações obstétricas, tais como trabalho de parto prematuro, recém nascidos de baixo peso ao nascer e ruptura prematura de membranas (MICHELIN et al., 2015a).

1.4- ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

O câncer do colo do útero é considerado um importante problema de saúde pública. Foi estimada a ocorrência de 527 mil casos novos em mulheres, no mundo, em

2012, configurando assim, o quarto tipo de câncer mais comum nessa população. Cerca de 70% dos casos diagnosticados de câncer do colo do útero ocorrem em regiões menos desenvolvidas e, quase um quinto ocorre na Índia (WHO, 2015).

A taxa de incidência do câncer do colo do útero vem diminuindo, ao longo das últimas três décadas, na maioria dos países em processo de transição socioeconômica. Tal fato reflete, principalmente, a implementação de programas de prevenção. Geralmente a doença começa a partir dos 30 anos e aumenta seu risco rapidamente até atingir as faixas etárias acima de 50 anos. No Brasil o número de casos novos esperados para 2016 é de 16.340, 7,9% de todos os casos, e é considerado o 3º em incidência logo após o câncer de mama e o de colon/retal, excluindo os tumores de pele não-melanocíticos (Inca 2016).

De acordo com a última estimativa mundial, essa neoplasia foi responsável por de 265 mil óbitos em mulheres em 2012, sendo que 87% desses óbitos ocorreram em países em desenvolvimento. A última informação para mortalidade no Brasil aponta que ocorreram, em 2013, 5.430 mortes por câncer do colo do útero em mulheres (INCA, 2016). A sobrevida em cinco anos para esse tipo de câncer obteve melhora ao longo dos anos, variando de menos de 50% para mais de 70% em todo o mundo, de uma forma geral. No Brasil, para o período de 2005 a 2009, a sobrevida ficou em torno de 61%.

Aproximadamente 291 milhões de mulheres no mundo apresentam infecção por HPV em algum período da vida, correspondendo a uma prevalência de 10,4%. Entretanto, mais de 90% dessas novas infecções por HPV regridem espontaneamente entre 6 a 18 meses. Existem hoje 13 tipos de HPV reconhecidos como oncogênicos pela Organização Mundial da Saúde. Desses, os mais comuns são o HPV16 e o HPV18.

Os estudos que avaliam a presença de DNA do HPV por PCR mostraram alguma variabilidade na distribuição etária. Eles têm geralmente confirmado a prevalência mais elevada em grupos de jovens. Alguns estudos têm apoiado um segundo pico aos 45 anos ou mais ao passo que, outros estudos observaram uma simples queda por idade (MONEY et al., 2007).

Quando avaliamos o Brasil, 16340 novos casos são esperados para o ano de 2016 de câncer de colo do útero, com um risco estimado de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo de útero é o primeiro mais incidente na Região Norte 23,97/100 mil. Ocupando a segunda posição vem as Regiões Centro-Oeste 20,72/100 mil e Nordeste 19,49/100 mil, na terceira e quarta posições a Região Sudeste com 16,30/100 mil e a Região Sul com 15,17 /100 mil respectivamente.

(KHAN et al., 1993) identificaram vários fatores de risco que contribuem ao desenvolvimento de lesões precursoras da neoplasia do colo uterino e o próprio câncer. Estas incluem infecção por certos tipos oncogênicos de papilomavírus humano (HPV), relação sexual precoce, múltiplos parceiros sexuais, multiparidade, uso prolongado de anticoncepcionais orais, tabagismo, baixo nível socioeconômico, infecção por *Chlamydia trachomatis*, deficiência de micronutrientes e uma dieta deficiente em vegetais e frutas.

Anualmente, cerca de 5-15% das mulheres previamente sem o vírus HPV são infectadas com qualquer tipo de HPV de alto risco e aproximadamente 25% da incidência da infecção se concentra na faixa etária dos 15-19 anos (SELLORS JW, KARWALAJTYS TL, KACZOROWSKI J, MAHONY JB, LYTWYN A, CHONG S, 2007). Estudos foram feitos em grupos de jovens, acompanhando-as antes e após iniciar a vida sexual, para averiguar o início da infecção. A incidência de infecção foi de 20% nos primeiros 12 meses, decaindo para 14% e 9%, no segundo e terceiro ano respectivamente, mostrando que a infecção ocorre com maior frequência no início da vida sexual. A duração média da infecção pelo HPV foi de 8 meses e após 12 meses da incidência da infecção, 70% das mulheres já não estavam infectadas; após 24 meses, apenas 9% continuaram infectadas, revelando que a maioria das infecções são transitórias (OH J-K, JU Y-H, FRANCESCHI S, QUINT W, 2008).

1.5- PAPILOMA VIRUS HUMANO –HPV

O HPV é um vírus da família *Papillomaviridae*, de formato icosaédrico sem envelope, com cerca de 55 nm de diâmetro e 8.000 pares de base. Apresenta um DNA circular de fita dupla, com oito regiões de leitura aberta e uma região regulatória. Os genes são designados como E (do inglês *Early*) ou L (do inglês *Late*) de acordo com o

estágio de diferenciação, na qual são expressos: E1 e E8, no início, e L1 e L2, que são expressos durante os estágios finais da diferenciação (LIMBERGER et al., 2012). Quanto aos genes, os mais estudados são o E6 e o E7 presente no subtipo 16, que é o mais prevalente (DEVILLIERS *ET AL.*, 2004). Figura 1.

(Jeon et al., 1995; Jeon & Lambert, 1995) mostram que essa integração faz aumentar a expressão de E6 e E7 (Jeon *et al.*, 1995; Jeon & Lambert, 1995) e essas oncoproteínas levam a alterações dos genes supressores tumorais, p53 e pRb respectivamente, sendo essenciais para indução da transformação celular e carcinogênese (Narisawa-Saito & Kiyono, 2007).

Com base na variação da sequência dentro da proteína do capsídeo L1 de subtipos de HPV, a família papilomavírus foi agrupada em de alto risco oncogênico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 68, 73 e 82) e baixo risco oncogênicos, que levam ao desenvolvimento de lesões não malignas (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89); e outros com dados epidemiológicos limitados que são classificados como prováveis tipos oncogênicos (MORENO et al., 2002).

Tabela 1 - Tipos de HPV segundo o nível de evidência sobre a carcinogenicidade do colo uterino

Grupo	Tipo de HPV	Comentários
1	16	Maior potencial oncogênico, causa câncer em várias topografias.
1	18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Evidência suficiente para causar câncer do colo do útero.
2A	68	Evidência limitada em humanos; forte evidência de mecanismo capaz de causar o câncer do colo do útero.
2B	26, 53, 66, 67, 70, 73, 82	Evidência limitada em humanos para causar câncer do colo do útero.
2B	30, 34, 69, 85, 97	Classificados, por analogia filogenética, para os tipos de HPV e evidência suficiente ou limitada em humanos para causar câncer do colo do útero.
3	6, 11	Não oncogênicos.

Fonte: (Bouvard, 2009) Adaptado.

Dos 15 sorotipos de risco elevado, os 16 e 18 representam cerca de 70% dos casos de câncer de colo uterino e cânceres cervicais (Castro-Vásquez, M. C.; Arellano-

Gálvez, 2010). A expressão clínica mais conhecida da infecção pelo HPV é conhecida por condilomas ou verrugas genitais, e, em 90% dos casos, há envolvimento de infecção pelos subtipos de HPV 6 e 11, e, mais raramente, pelos tipos 16 e 42. Tem sido relatados que estes sorotipos virais podem ser transmitidos verticalmente durante o parto (Piqué, X. C.; José, 2008).

A incidência de pacientes com infecções por HPV de alto risco é mais elevada do que a de baixo risco. Um exemplo disso é o caso do HPV tipo 16 que é o mais prevalente nas infecções do trato genital chegando até 66%, seguido dos tipos 18(15%), 45(9%) e 31(6%) sendo que os 4 tipos juntos, podem corresponder a um total de até a 80% dos casos (MUÑOZN, ET. COL., 2004). O tipo 16 também é o tipo mais comum detectado no carcinoma cervical invasor e o tipo mais prevalente em quase todas as partes do mundo, sendo também, o mais persistente, com duração de 12 meses ou mais, enquanto infecções por outros tipos de HPV duram 6-8 meses (CANCER., 2005). Portanto, mulheres com HPV 16 e 18 têm um risco aumentado de desenvolver câncer cervical quando comparadas com as que têm outros tipos. Mulheres infectadas quando comparadas com mulheres sem infecção, têm risco relativo (RR) maior para desenvolver lesão precursora chegando a 10,2. Estudos recentes têm demonstrado que existem diferenças de risco de desenvolver o câncer cervical de acordo com as variações do vírus HPV tipo 16 (HILDESHEIM A, ET. COL., 2001).

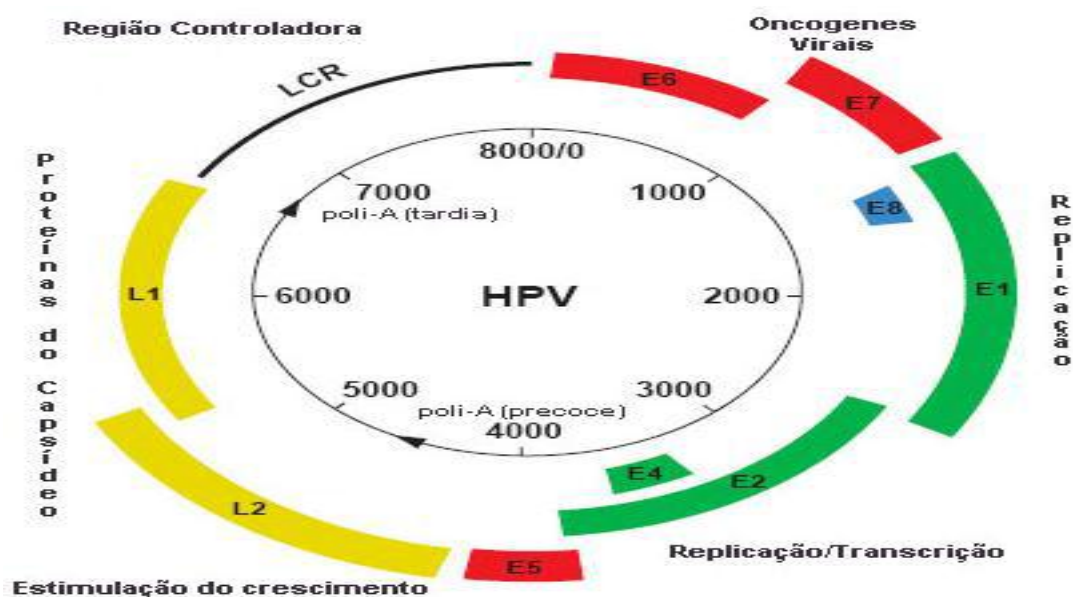


Figura 1 Organização genômica do vírus do papiloma humano. Fonte: (Prendiville, W.; Davies, 2004) adaptado.

Vírus penetram nas células epiteliais e provocam manifestações clínicas como lesões em peles e mucosas, entretanto essas infecções não necessariamente causam os carcinomas e as verrugas, também denominadas condilomas acuminados ou popularmente conhecidas como crista de galo. O indivíduo infectado pode não apresentar manifestações clínicas, sendo isento de lesões macroscópicas, a esse tipo de infecção chamamos de assintomática, latente ou subclínica (XAVIER ET AL., 2007).

Quando avaliamos a maioria das mulheres infectadas pelo HPV não observamos manifestações clínicas. Essa infecção comumente cresce de forma limitada, evolui lentamente, é autorresolutiva, transiente, geralmente involui naturalmente (NORONHA ET AL., 2005) sem nenhum método terapêutico em até 80% dos casos, sendo bastante baixa a quantidade de infecções com lesões aparentes – 1 a 2% (XAVIER ET AL., 2007). Já quando temos a presença de lesões, observamos uma maior prevalência em indivíduos imunodeprimidos por conta de transplantes, uso de corticosteróides, radioterapia ou quimioterapia, bem como nos pacientes HIV-soropositivos (Belsito et al., 1982; Chopra & Tyring, 1997; Southern & Herrington, 1998).

1.6 - NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

Em 1967, Richart definiu, com base em seu estudo sobre a história natural da doença, o conceito de NIC para as alterações histológicas. Ele considerou esse conjunto de alterações como etapas de um único fenômeno, contínuo e progressivo, que se caracterizava por graus de atipias celulares abrangendo parte ou toda a espessura do epitélio cervical. O autor dividiu essas lesões em três graus: NIC I, caracterizada por atipias celulares localizados no terço do epitélio escamoso mais próximo da membrana basal; NIC II, em que as atipias ocupam os dois terços mais próximo da membrana basal desse epitélio; e NICIII, em que as células atípicas comprometem mais de dois terços ou toda a espessura do epitélio. NIC I, NIC II e NIC III correspondem, respectivamente, a displasia leve, displasia moderada e displasia acentuada/carcinoma *in situ*.

Em 1998 foi criado, na cidade de Bethesda (Maryland/EUA), um novo sistema de classificação citológica para o colo de útero com o objetivo de unificar a terminologia e incorporar novos conceitos sobre a história natural do câncer nesse sítio.

Esse mesmo sistema foi revisto em 2001 e é utilizado até o presente. A classificação foi dividida em dois modos, lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) correspondentes a NIC I, e lesões escamosas de alto grau (HSIL) correspondentes as NIC II e III de acordo com os achados histológicos e os diferentes graus de diferenciação celular. Para atipias escamosas de significado indeterminado foram criados os termos ASCUS, mas se encontrado células escamosas atípicas, o termo ASC-H foi introduzido afim de que não se exclua a possibilidade de lesão de alto grau (SOLOMON, 2002)(Nayar, R.; Wilbur, 2015). Figura 2.

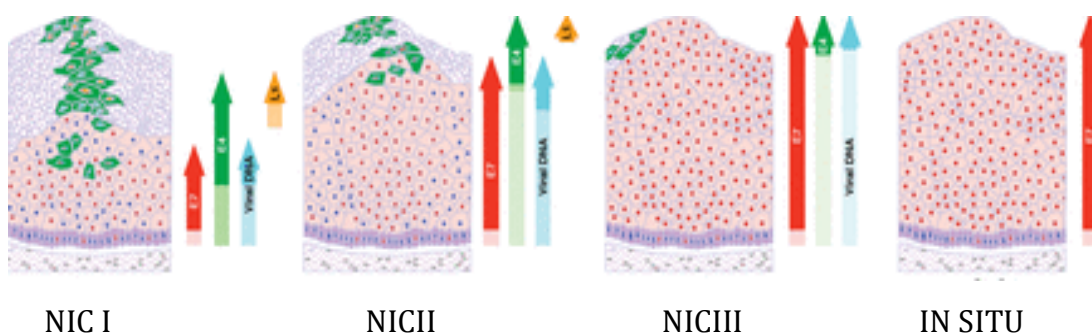


Figura 2. Alterações nos padrões de expressão que acompanham a progressão para o câncer cervical. Fonte: (John Doorbar, 2006) adaptado.

Tabela 2 - Analogia entre as nomenclaturas citopatológicas e histopatológicas das lesões cervicais.

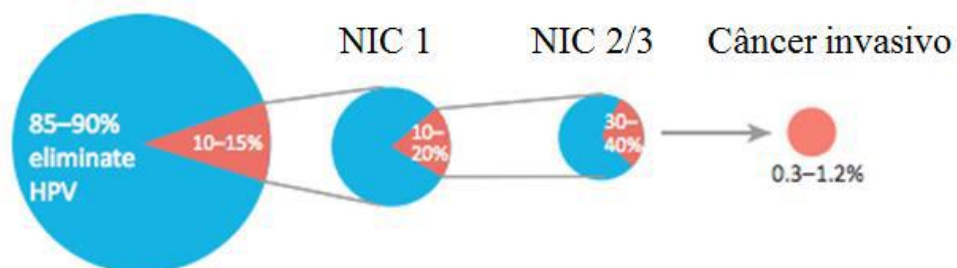
Classificação citopatológica de Papanicolaou (1941)	Classificação histológica da OMS (1952)	Classificação histológica de Richart (1967)	Classificação citopatológica Brasileira (2006) (Adaptada de Bethesda)
Classe I	-	-	-
Classe II	-	-	Alterações benignas Atipias de significado indeterminado
Classe III	Displasia leve	NIC I	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL)
	Displasia moderada e acentuada	NIC II e NIC III	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL)
Classe IV	Carcinoma in situ	NIC III	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) Adenocarcinoma in situ (AIS)
Classe V	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor

Fonte: INCA, 2011.

De acordo com Solomon *et al.* uma mulher com citologia de ASC tem chance de apresentar lesão de alto grau em torno de 5 a 17% dos casos (SOLOMON, 2002). Por outro lado, a NIC II e a NIC III estão presentes em 24 a 94% dos resultados citológicos de ASC-H. Em relação aos laudos citológicos de lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau, estima-se que 15 a 30% representem, na verdade, NIC II ou NIC III. Todavia, um diagnóstico citológico de lesões intraepiteliais de alto grau traduz a presença de NIC II ou NIC III em 75% dos casos e de carcinoma em 1 a 2% (WRIGHT TC, MASSAD S, 2007).

Quanto a progressão ou regressão das Neoplasias Intra-epiteliais Cervicais, (Östor *et al.*, 2007) analisando a história natural das neoplasias intraepiteliais cervicais por meio de uma revisão da literatura, verificou que as taxas de regressão de NIC I foi de 57% enquanto que a persistência, progressão para NIC III, e de progressão para invasão foram de 32%, de 11% e de 1%, respectivamente. Já a taxa de regressão de NIC II e de progressão para invasão foi 32% e 12%, respectivamente (AG., 1993).

Figura 3 - A progressão da infecção do HPV até o câncer do colo do útero. Fonte: (Shulzhenko, 2014) adaptado.



O diagnóstico precoce das lesões precursoras pode ser inicialmente suscitado a partir de uma simples coleta da citologia cérvico-vaginal de rotina e confirmado pela biópsia guiada pela colposcopia, o que possibilita o tratamento dessas lesões de forma precoce, impedindo sua progressão para o câncer. O padrão-ouro para o diagnóstico das neoplasias intraepiteliais cervicais continua sendo a histopatologia. Apesar de os aspectos colposcópicos poderem sugerir que uma lesão intraepitelial seja de baixo ou de alto grau de forma satisfatória, na maioria dos casos é difícil diagnosticar uma invasão incipiente por meio da colposcopia. Portanto, o diagnóstico de invasão incipiente requer

a combinação de ambos os indicadores, colposcópicos e histológicos (SUSANA AIDÉ, GUTEMBERG ALMEIDA, ISABEL DO VAL, NELSON VESPA JUNIOR, 2009).

1.7- RESPOSTA IMUNE AO PAPILOMA VIRUS HUMANO

Os vírus são microorganismos que obrigatoriamente infectam as células através de várias moléculas de superfície celular e de outros receptores (Gonçalves e Gonadi, 2004).

O controle da infecção por HPV quando caminha para a neoplasia cervical depende tanto da resposta imunitária inata quanto da adaptativa. Os dados disponíveis sobre respostas imunitárias humorais indicam que apenas metade das mulheres naturalmente expostas ao HPV desenvolverão respostas imunes ao vírus (Stanley M, 2003).

Vários componentes da resposta imune inata e adaptativa são mobilizados para o reconhecimento das infecções por HPV e para eliminar as células infectadas pelo vírus. A primeira linha de defesa consiste na resposta imune inata que ocorre na epiderme e no epitélio das mucosas (TIRONE et al., 2009). Estudos recentes descrevem como o HPV interage com o sistema imune e como o vírus pode evadir ou inativar a resposta imune adquirida (FRAZER, 2004). Existem várias razões para isto, que estão diretamente ligadas ao ciclo de vida do vírus. Primeiro, o vírus não tem uma fase de disseminação sanguínea; segundo, não causa lise dos queratinócitos, e portanto, não induz uma resposta inflamatória; e terceiro, a produção e liberação do vírus se dá nas células escamosas diferenciadas que estão distantes das citocinas e células imuno-competentes na submucosa (HOULIHAN et al., 2012).

O complexo imune do epitélio de revestimento é representado pelas respostas imunes inata e adaptativa como também pelas imunoglobulinas segregadas localmente que são importantes na defesa. Infelizmente, os estudos clínicos de IgA e IgG e controle HPV continuam a mostrar resultados mistos e controversos (Nguyen Hh, et. al., 2005).

Pacientes com infecções transitórias por HPV são menos propensas a desenvolver respostas imunes de memória do que as que têm infecções persistentes, De forma consistente, a identificação dos anticorpos no soro contra péptidos derivados de

proteínas do HPV estão mais presentes em mulheres com câncer do colo de útero do que em mulheres saudáveis ou que tiveram infecções transitórias (MOSCICKI et al., 2006).

1.7.1: A Imunidade Inata e HPV

A Imunidade Inata corresponde a primeira defesa do organismo a um dano tecidual. Compreende-se em um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis, além de apresentar como sinais clínicos característicos como rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional. Assim, a finalidade desse processo é remover o estímulo indutor da resposta e iniciar a recuperação tecidual local (ABBAS AK, 2003).

Nesse raciocínio, mulheres expostas transitoriamente a infecções por HPV, são menos propensas a desenvolver respostas de anticorpos ou respostas mediadas por células, do que as mulheres com infecções persistentes, o que sugere que a resposta imune inata pode eliminar rapidamente antígenos antes que haja uma chance de se desenvolver resposta de memória (KONYA J, 2001).

1.7.2: Resposta Humoral e HPV:

As respostas humorais as infecções ocorrem naturalmente e exercem pouco efeito protetor contra a persistência do HPV ou da doença. O desenvolvimento de anticorpos específicos contra o HPV é encontrado em mulheres com história crônica de exposição ao vírus. Isso favorece outros mecanismos de escape do vírus e ao mesmo tempo a progressão da lesão (MOSCICKI et al., 2006).

Entre as mulheres que desenvolvem esta resposta, existe um atraso de vários meses que reforça a capacidade do HPV para evadir a resposta imune por um período de tempo (De Jong A et. al., 2004).

1.7.3: Resposta Imune Adaptativa e HPV

O aparecimento de infecção persistente por HPV demonstra que o sistema imune inato é muitas vezes contornado. O período entre a infecção dos queratinócitos basais e o aparecimento de lesões é muito variável em estudos de história natural, demonstrando

assim, a capacidade do HPV em iludir de forma eficaz o sistema imunitário durante vários meses ou mesmo anos (Moscicki et. al., 2001).

Estudo evidenciam boas respostas clínicas quando as respostas imunes são mediadas por células favorecendo a eliminação do vírus após a infecção ser estabelecida. Alvos que aparecem ser importantes no controle do HPV incluem as oncoproteínas E6 e E7 e da E2 gene (M, 2005)

1.7.4: Citocinas e Perfil de Resposta Imune (Th1 / Th2) e HPV:

O modelo de regulação imune Th1 / Th2 agora bem estabelecida, descreve uma dicotomia fenotípica entre linfócitos T na identificação de subconjuntos de células TCD4+, T auxiliar ou T helper (Th) que diferem nas citocinas que produzem e nas suas funções efetoras (ZHU, J. & PAUL, 2008).

Tipo de th1 (Th1) células efetoras/memória produzem predominantemente IFN- γ e promovem respostas dirigidas contra agentes patogênicos intracelular e um papel particularmente importante na resistência a infecções por micobactérias como também algumas doenças auto-imunes. Além do IFN- γ , são responsáveis também pela produção da IL-10 e IL-2 (ZHU, J. & PAUL, 2008) (Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pillai, 2008) .

As células do tipo Th2, são responsáveis pela produção de IL-4, IL-5 e IL-13 (mas não IFN- γ) e promovem respostas humorais (De Jong A, et. al., 2004). Elas são importantes na indução e persistência de doenças alérgicas, estimulam células B e inibem ativação de macrófago, resultando em infecção progressiva (ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, 2008).

Sabendo que os subconjuntos Th1 e Th2 se desenvolvem dos mesmos precursores que são os linfócitos TCD4, o padrão de diferenciação é determinado por estímulos presentes ao longo da cadeia de resposta imunológica que podem amplificar ou mesmo regularizar resposta cruzada entre os subconjuntos. Dessa forma, uma vez que a resposta imunológica se desenvolve ao longo de uma via, ela pode se polarizar e se diferencia em um subconjunto. Quanto se avalia o estímulo da indução para a diferenciação, interleucinas são responsáveis tais como IFN- γ e a IL-2 são indutores do perfil Th1, e a IL-4, de células Th2 (ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, 2008)

(ZHU, J. & PAUL, 2008).

Além dos perfis Th1 e Th2, outros subtipos como, Th9, Th17 ou Treg, que constituem 5-10% do total populacional de células Linfócitos T CD4, estão envolvidos na modulação das respostas imunológicas, sendo estes principalmente envolvidos na regressão de doenças auto-imunes (MICHELIN et al., 2015b).

A resposta imune pode ser evidenciada em certos estudos em que mulheres assintomáticas infectadas com DNA de HPV apresentavam resposta Th1 contra os antígenos do HPV enquanto as Tregs foram encontradas em mulheres com câncer. Os linfócitos de mulheres assintomáticas secretam INF- γ , TNF, IL-2, IL-5 em resposta aos antígenos do HPV. No entanto, linfócitos de mulheres com tumor tinham respostas muito fracas e secretavam apenas IL-10 em resposta aos mesmos antígenos (De Jong, A. et. al., 2004). A IL-10 é uma citocina indutora do fenótipo regulador das células T (NIEDERKORN, 2008).

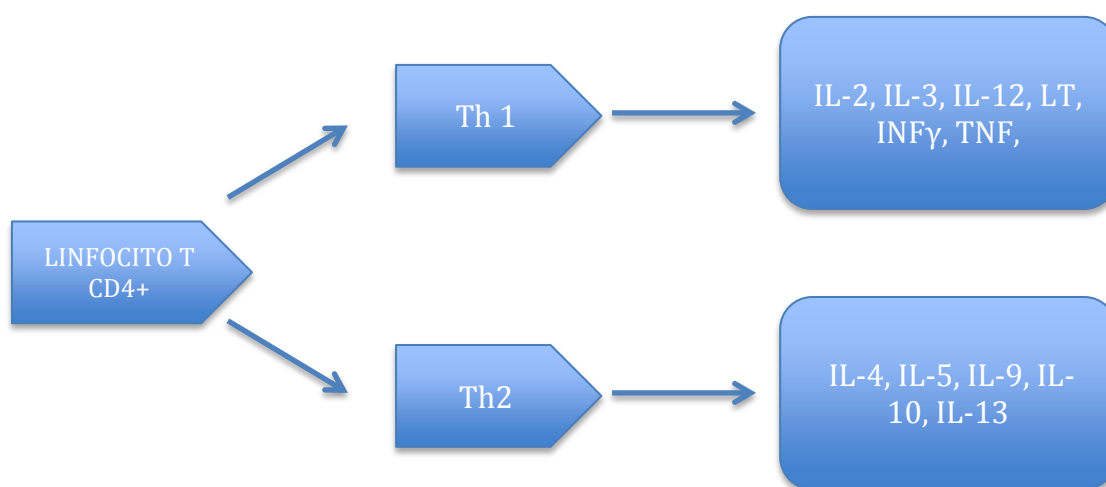
Os avanços na compreensão do sistema imunológico como também a definição dos perfis Th1 e Th2 vem oferecendo novas estratégias terapêuticas. Assim, a imunoterapia tem o potencial para se tornar uma modalidade de tratamento para tumores. A imunoterapia com Interferon (IFN) tem sido recentemente usado em lesões intra-epiteliais de colo do útero e câncer cervical invasivo com resultados promissores (Murta & Tavares-Murta, De 2004; Ferrantini Et Al., 2000); ((MACHADO; MICHELIN; MURTA, 2011).

1.8- CITOCINAS

As citocinas são proteínas produzidos durante a fase de ativação e efetora da imunidade inata e específica. São secretadas por vários tipos celulares (macrófagos, leucócitos, células *natural Killer* e outras) e agem de maneira autócrina (quando afeta a própria célula que a produz), parácrina (quando altera células vizinhas) e, às vezes, endócrinas (quando altera células à distância, via hematogênica) (LUCEY DR, CLERICI M, 1996). As respostas imunes são mediadas pela liberação de diferentes citocinas que podem influenciar na síntese e na ação umas das outras formando um sistema de interrelação das citocinas imunorreguladoras.

As citocinas produzidas após uma infecção são classificadas como imunestimulante do tipo Th1 que são os interferons (IFNs), fator de necrose tumoral alfa (TNF), Interleucina-2 (IL-2) e interleucina-12 (IL-12) que induzem principalmente imunidade celular, e citocinas tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10) que são inibidoras da resposta imune mediada por células e predominantemente induzem resposta humoral (Clerici et. al., 1994; Mosmann et. al., 1996; Spellberg et. al., 2001).

Figura 4: Perfil das citocinas.



IL: INTERLEUCINAS; INF: INTERFERON; TNF: FATOR DE NECROSE TUMORAL; LT: LINFOTOXINA

Vários estudos demonstram uma mudança no padrão do perfil de citocinas em direção ao perfil Th2 à medida que a lesão promovida pelo HPV se agrava. (SCOTT M, STITES DP, 1999) (De Jong, A. et. al., 2004) mostram que a resposta Th1 parecem ser mais importantes no controle da infecção do HPV (Anna Barbara Moscicki et. al., 2006).

As citocinas tipo I que incluem IL-2, a IL-12 e Interferon gama (IFN- γ) são potentes ativadores da resposta celular imune e tem se demonstrado uma ação antitumoral e anti-metastática contra os tumores (Clerici M, et. col., 1994). Adicionalmente, a IL-12 pode regular positivamente (isto é) aumentar a produção de IFN- γ (Gately MK, et. col., 1994). A IL-2, IL-12 e IFN- γ juntamente com Linfócitos T Citotóxicos (CTL) e células naturais assassinas (Natural Killer –NK) assumem resposta citolítica mediada por células que fornecem mecanismos de defesa eficaz antitumoral.

Além disso, a IL-2 pode induzir a transformação e ativação de células NK que passam a destruir as células tumorais, melhorando assim a resposta imune (CLERICI et al., 1997). Quadro 1.

Em contraste, as Interleucinas tipo II (IL-10 em particular) foram associadas com crescimento e desenvolvimento tumoral. Assim, a produção de IL-10 encontra-se aumentada em certos tumores, incluindo cânceres Linfocíticos B, cutâneas basais e carcinomas de células escamosas. Além disso, o tumor derivado da resposta tipo II, apresentam uma ação antitumoral menor inibindo assim a apresentação do antígeno tumoral as células da resposta inata (Bost KI, Bieligk Sc, 1995).

Adicionalmente, as células regulatórias da resposta imune que expressam as moléculas CD4 e CD25 e produzem IL-10 e/ou TGF, chamado perfil Th3 e Treg, estão também envolvidos em modular a resposta imune, impedindo ou diminuindo as consequências das reações de hipersensibilidade e de doenças auto-imunes (Lee et. al., 2004).

E finalmente, a função das células T auxiliares pode ser analisada em profundidade, estimulando as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) com antígenos que ativam a resposta imune através de diferentes T-Helper (CLERICI et al., 1997).

Figura 5: Citocinas relacionadas com a Neoplasia Intraepitelial Cervical e Infecção pelo HPV. Fonte: (Linsingen, 2008) adaptado.

Resposta Imune	Citocina	Ação	Referência
Th1	↓Th1	Predisposição às lesões de alto grau	Lee <i>et al.</i> , 2004
Th2	↓TNF	Susceptibilidade à persistência viral	Kirckpatrick <i>et al.</i> , 2004
Th2	↑IL-10	Progressão da lesão cervical	Fernandes <i>et al.</i> , 2004
Th1	↓IFN- γ	Progressão da lesão cervical associada ao HPV	El Sherif <i>et al.</i> , 2001
Th2	↑IL-10	Progressão da lesão cervical associada ao HPV	Stanczuk <i>et al.</i> , 2001
Th1	↑ IL-2, IFN- γ , TNF ↓ IFN- γ	Regressão de verrugas genitais Pior prognóstico CC	Tartour <i>et al.</i> , 1998
Th2	↑IL-4, IL10	Pior prognóstico em pacientes com NIC e HPV	Clerici <i>et al.</i> , 1997
Th1	↓IL-2, IFN		
Th1	IL-2	Produção diminui com a progressão da lesão	Tsukui <i>et al.</i> , 1996
Th2	IL-10	Reativação de infecção latente pelo HPV	Garzetti <i>et al.</i> , 1996

1.9-MECANISMOS QUE LIGAM À INFLAMAÇÃO AO CÂNCER

O meio inflamatório é ocupado por células tais como macrófagos residentes e recrutados, DCS, células T, e células NK. Entre estes, macrófagos associados a tumores (TAMs) e as células T estão presentes num tumor. As células do sistema imunológico infiltrados neste meio podem exercer efeitos bastante paradoxais durante o desenvolvimento do câncer (Mantovani et al., 2002).

Dados atuais apontam que a inflamação aguda desencadeada por leucócitos, não exercem mecanismos imuno protetores normais que levem à erradicação e a evolução do câncer (imunidade antitumoral). Em contraste, observa-se que mediadores pró-inflamatórios produzidos excessivamente e cronicamente podem contribuir para a promoção e progressão tumoral (Smyth et.al., 2004).

No microambiente do tumor, existe um equilíbrio delicado entre a imunidade antitumoral e a atividade pró-inflamatória originária do tumor, o que enfraquece a imunidade antitumoral. Estas atividades vão depender de diferentes mediadores que são liberados pelas células inflamatórias hospedeiras, células cancerosas e outros tipos de células hospedeiras associados ao tumor (tais como os fibroblastos e células endoteliais) (Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., And Arihiro, 2006). Quando a atividade antitumoral mediada pelo hospedeiro é mais fraca do que a atividade imunossupressão mediada por tumor, as células tumorais sofrem um escape imunológico e crescem rapidamente.

Em contraste, quando a imunidade antitumoral mediada por hospedeiro é mais forte do que a atividade imunossupressora mediada por tumor, as células tumorais são eliminadas. O resultado líquido desse microambiente inflamatório persistente é reforçado pela progressão de tumores, invasão dos tecidos adjacentes, a angiogênese e muitas das vezes, a metástases. A ligação molecular chave entre a inflamação e a progressão tumoral está na via de sinalização, a qual é ativada por muitas citocinas pró-inflamatórias (Lin, W.J., And Yeh, 2005).

1.10- INTERFERON

Interferons (IFNs) foram primeiramente descritos por Isaacs e Lindenmann em

1957. São um grupo de proteínas imunoreguladoras sintetizadas por linfócitos T, macrófagos, fibroblastos e outros tipos de células, em resposta as infecções virais, exposição ao RNA de cadeia dupla, certos polissacarídeos, toxinas microbianas e outros estímulos, tais como vários antígenos tumorais. Eles se ligam a receptores específicos nas membranas celulares e exibem seus efeitos aumentando a capacidade dos macrófagos para destruir células tumorais, vírus e bactérias e reforçando a atividade citotóxica dos linfócitos T (Yan J, Chen Sl, Wang Hn, 2006).

Os IFNs representam um grupo de citocinas que desempenham importantes ações antiviral, antitumoral, imunomoduladora e atividades antiangiogênicas no sistema imunológico. Esta última função é de fundamental importância para a inibição da formação de metastases (Woodwort Cd, 1993)(MACHADO; MICHELIN; MURTA, 2011).

Os IFNs podem ser divididos em três classes principais (alfa, beta, gama) de acordo com as propriedades físico-químicas, as células de origem, o modo de indução e de reações de anticorpos. Todos esses tipos de IFN tem a função de inibir a expressão do RNAm através das proteínas E6 e E7 em células infectadas com o HPV. Estudos *in vitro* demonstram a ocorrência de eventos intracelulares, tais como indução de determinadas enzimas; supressão da proliferação celular; atividades imunomoduladoras como reforço da atividade fagocítica dos macrófagos e aumento da citotoxicidade específica de linfócitos para células-alvo e a inibição da replicação do vírus em células infectadas. Devido à ação imunoestimulante e antiviral, o tratamento com IFN é indicado para verrugas, sendo administrado localmente (injeções intralesionais e aplicações tópicas) ou sistemicamente (injeções subcutânea e intramuscular) (Yang et. al., 2009).

Grandes avanços tecnológicos têm facilitado a visualização dos mecanismos de ação do IFN tipo I. Efeitos antitumorais podem ser mediados através de ações diretas sobre a proliferação e composição de células tumorais e antígenos, ou através de ações indiretas, como modulação das interações de populações de células efetoras imunes, como as células T citotóxicas e células dendríticas, com células tumorais específicas (Kufe et al., 2003). Os IFNs podem induzir também a apoptose e a ativação da cascata de citotoxicidade específica de linfócitos para células-alvo (Thyrell L et. al., 2002).

Além disso, alguns estudos sugerem que o IFN tipo I pode produzir um efeito anti-tumoral importante, favorecendo o aumento da presença de células T citotóxicas, células assassinas naturais (NK) e de células dendríticas (LINDNER, 2002).

Avanços na compreensão do sistema imunológico e na definição de antígenos de células tumorais têm levado a novas estratégias terapêuticas. Assim, a imunoterapia tem o potencial para se tornar uma extraordinária modalidade específica de tratamento para tumores. A imunoterapia com o interferon (IFN) tem sido recentemente usado nas lesões intra-epiteliaias de colo do útero e câncer cervical invasivo com resultados promissores (Machado et. al., 2011).

Quanto ao uso de Interferon para o tratamento de NIC iniciou-se nos primeiros anos de 1980 e talvez, devido as dificuldades de se obter uma boa resposta clínica, estudos que abordavam este tipo de tratamento foram praticamente restritos aquela década. No entanto, depois de alguns anos, verificou-se que certas linhagens de células eram extremamente sensíveis a este mediador. IFN- α induz apoptose de determinadas linhas de células, incluindo as células de melanoma, células de carcinoma do ovário e células de mieloma múltiplo (CHAWLA-SARKAR, M.; LEAMAN, D.W.; BORDEN, 2001).

1.11: TRATAMENTO E IMUNOTERAPIAS

Segundo o Conselho Federal de Medicina (2002) o tratamento de lesões de alto grau busca a redução ou a eliminação das lesões causadas pelo HPV. Pode ser feita através da retirada da lesão, por métodos físicos ou químicos que destroem a mesma, ou através da imunomodulação. Em alguns casos a combinação de uma ou mais dessas opções de terapias é recomendada (SNOECK, R; ANDREI, G; DE CLERRQ, 1998).

A escolha da terapia deve ser feita a partir de critérios que levem em conta a localização da lesão, sua extensão e agressividade, assim como o estado imunológico, a idade do paciente, a eficácia e os possíveis efeitos colaterais pois, a maioria dos

tratamentos disponíveis, apesar de possuir alguma eficácia, apresenta uma alta taxa de recorrência (Passos, 2008).

Estudos visando a compreensão de como a tolerância, a imunidade e a imunossupressão regulam a respostas antitumorais, aliadas a terapia alvo, sugerem que a ativação imunológica seja o caminho para obter uma resposta longa e durável nos pacientes com câncer (Mellman, I.; Coukos, G.; Dranoff, 2011).

O conceito de imunoterapia contra o câncer foi introduzido no final do século XIX, quando pela injeção de produtos bacterianos em volta do tumor. Desde então, observações como a maior incidência de câncer em pacientes imunodeprimidos e uma maior identificação de antígenos e linfócitos específicos do tumor estimularam pesquisas visando induzir respostas imunes específicas (LESTERHUIS; HAANEN; PUNT, 2011).

Desde o início de 1980, vários estudos têm usado Interferon no tratamento de câncer ginecológico com respostas diferentes (Nomelini, et. al., 2007). No caso do interferon-2 α , alguns estudos mostraram remissão da neoplasia intraepitelial cervical, variando de 30% a 80% dos casos (Choo et. al., 1986). No caso de câncer invasivo, há relatos de cura do carcinoma invasivo da vagina usando Interferon intralesional α -2b (MURTA, E.F.C.; TAVARES MURTA, 2004).

A utilização de imunomoduladores como tratamento do câncer tem sido muito empregado atualmente pela capacidade de estimular resposta imune efetora do próprio hospedeiro a reconhecer os antígenos tumorais e a combater as células infectadas (NELSON, R. P.; BALLOU, 2003)

2- JUSTIFICATIVA

A necessidade de se desenvolver novos tratamentos clínicos para lesões de alto grau em colo e útero, tem crescido nas últimas décadas, uma vez que, estão presentes cada vez mais em paciente jovens. Observa-se também que a gravidez, tornou-se um evento cada vez mais tarde na vida das mulheres (MOSCICKI, 2007). Pensando nisso, o tratamento conservador com Interferon Peguilado subcutâneo pode estar entre as opções

terapêuticas para pacientes em idade fértil, já que observa-se uma facilidade terapêutica e posológica além de não alterar a anatomia do colo do útero, fator mais importante, sendo responsável pela geração de complicações durante a gravidez (MICHELIN et al., 2015a).

O nosso estudo baseou-se na necessidade de avaliarmos o comportamento das interleucinas durante o tratamento com aplicações semanais de IFN Peguilado 2b subcutâneo através da análise do soro periférico das pacientes com diagnóstico de NIC II e NIC III.

Esperamos que a partir dos nossos estudos, possamos avaliar os resultados e facilitar o entendimento das causas que levam determinados organismos a não eliminarem as infecções por HPV e ao mesmo tempo evoluírem para lesões pré-neoplásicas e posteriormente para o câncer.

3- OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é avaliar a resposta imunológica através da dosagem seriada de citocinas pelo método de Elisa colhidas de amostras de sangue periférico em pacientes previamente diagnosticadas com lesões de alto grau (NIC II e NIC III) durante o tratamento semanal com IFN Peguilato 2-b administrado subcutâneo.

Avaliaremos também:

- Quais vias inflamatórias houveram alterações;
- Quantas pacientes obtiveram boa resposta ao tratamento e
- Quantas não responderam até o final do tratamento.

4- PACIENTES E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

O presente estudo foi realizado no Ambulatório Maria da Glória no setor de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas da UFTM com pacientes selecionados aleatoriamente com o diagnóstico histológico de Neoplasia Intraepitelial Cervical de

alto grau NIC II e NIC III.

A triagem e o seguimento das pacientes foram realizados pelo serviço de colposcopia oncológica no qual eram oferecidos à paciente várias formas de tratamento, incluindo desde LEEP/CAF, Conização, Histerectomia em alguns casos ou o IFN Peguilado 2b. O trabalho obteve aprovação do comitê de ética em pesquisa da Universidade e a análise das amostras foram realizadas pelo Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) e pelo serviço de Patologia.

As pacientes foram selecionadas seguindo os critérios de inclusão e exclusão observados e aprovados pelo Comitê de Ética. Para atender aos objetivos do estudo para o tratamento com IFN as pacientes respondiam a um questionário como pré-requisito. e as informações eram passadas de forma didática e sucinta para que não houvesse erro de interpretação. Estando esclarecidas e de acordo em participar, assinavam o “Termo de Consentimento Livre” (Anexo-1). Uma cópia ficava com a paciente e uma outra em anexo ao trabalho como também arquivadas em prontuário médico (SAME).

Os critérios para inclusão no estudo são:

- Ausência de sangramento durante o exame;
- Colposcopia satisfatória;
- Não utilização de antibióticos orais, fungicidas ou cremes vaginais durante os 30 dias anteriores;
- Sem atividade sexual por dois dias que antecedem a coleta de amostra;
- Sem histórico prévio de tratamento para HPV.

Os critérios de exclusão no estudo são:

- Doenças imunossupressoras;
- Fumantes;
- Cardiopatias graves, alterações na função renal ou hepática;
- Gravidez;
- Intolerância relatada ao IFN.

O estudo compreendeu 17 pacientes as quais foram submetidas inicialmente a colheita de 2 tubos a vácuo contendo 4ml de sangue por paciente contendo

anticoagulante EDTA, esse material foi encaminhado ao Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON).

Após a coleta de sangue para obtenção do soro, a mesma era submetida a exame ginecológico com exposição do colo do útero através da introdução de um espécuro vaginal sendo coletado secreção vaginal como também biópsia dirigida do colo uterino pela colposcopia. Material também encaminhado para o IPON e para a Patologia.

Em seguida era feito a aplicação do IFN Peguilado 2b a uma dosagem de 80 mcg /0,5 ml por via subcutâneo abdominal sendo administradas 01 ampola semanal durante 6 semanas sob orientação e acompanhamento médico.

Figura 6: Descrição das etapas do procedimento.



Todas as 17 pacientes selecionadas aderiram e passaram por todas as etapas do estudo sem que houvesse desistência ou perda de seguimento.

4.2 APLICAÇÃO DO INTERFERON

Foi usado neste trabalho o Interferon Alfa-2b 80 *mcg/0,5 ml* (Shering-Phough®). Cada caixa da medicação é composta de um frasco-ampola com pó liofilizado acompanhado de ampola com diluente de 1,0 ml que foram acondicionados em geladeira à temperatura de 4° C. O medicamento foi mantido fora do refrigerador por cerca de 15 minutos antes de sua utilização.

Para a reconstituição foram adotados os seguintes passos (orientados na bula da medicação):

- 1-Retirou-se o lacre de plástico do frasco-ampola pó liofilizado;
- 2- Fez-se a limpeza da superfície da tampa com algodão umedecido com álcool;
- 3- Abriu-se a ampola de diluente e, com auxílio de uma seringa, retirou-se a água da ampola de diluente;
- 4- Perfurou-se a parte central da tampa do frasco-ampola do liofilizado e injetou-se o diluente vagarosamente;
- 5- Agitou-se suavemente aguardando a completa dissolução do liofilizado;
- 6- Retirou-se com o auxílio de uma seringa de 1ml a solução reconstituída.

As aplicações foram feitas utilizando-se seringa de 1,0 ml e agulha 13 x 0,45 uma vez por semana durante 6 semanas consecutivas, perfazendo um total de 6 aplicações.

Antes de iniciarem o tratamento, foram solicitadas as dosagens de marcadores da função renal (Ureia e Creatinina), função hepática (AST e ALT), Hemograma, sorologias (HIV, AG-HBS, ANTI-HCV E VDRL) juntamente com B-HCG uma vez que haveria a possibilidade de influência do interferon nestes fatores.

4.3 COLPOSCOPIA

Hinselmann, pioneiro da colposcopia na Alemanha, publicou o primeiro artigo sobre esta técnica em 1925, tendo descrito as principais lesões benignas e malignas do colo do útero (H.VERBESSENUNG, 1925).

Nesta técnica, provido de um colposcópio (microscópio binocular constituído por um sistema de lentes e uma poderosa fonte de luz) e com o colo uterino visualizado, aplicava-se inicialmente ácido acético a 5% no cérvix. Neste momento a localização da junção escamocolunar é um passo importante na interpretação da colposcopia. O ácido acético provoca edema dos tecidos e coagulação superficial das proteínas intracelulares, reduzindo a transparência do epitélio e nos casos de lesões de alto grau (NIC II e NICIII) o branqueamento.

Após o ácido acético, aplica-se solução iodada a 1%, formada por 2 g de iodo e 4 g de iodeto de potássio, diluídos em 200 ml de água destilada (LUGOL). Este provoca uma coloração acastanhada escura proporcional a concentração de glicogênio.

E por fim, o uso de Bissulfito como método de realce das lesões previamente identificadas pelo LUGOL e Ácido Acético.

A classificação colposcópica utilizada no presente estudo seguiu a normatização da Internacional Federation for Cervical Pathology and Colposcopy (IFCPC) determinada em Roma, no ano de 1990 (STAFIL & WILBANKS, 1991). De acordo com essa classificação, são considerados achados normais o epitélio pavimentoso original, o epitélio cilíndrico e zona de transformação normal. Os critérios de anormalidade são divididos, de acordo com a sua gravidade, em lesões maiores e lesões menores. São consideradas lesões menores as que apresentam epitélio acetobranco fino, mosaico regular, leucoplasia fina e vasos típicos. Já as lesões maiores caracterizam-se por epitélio branco espessado, mosaico irregular, pontilhado irregular, leucoplasia espessada e vasos atípicos.

Observados os critérios de inclusão e exclusão, as pacientes selecionadas acima, já biopsiadas para lesão de alto grau, foram devidamente encaminhadas para a realização de colposcopia em nosso serviço de Colposcopia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) para a coleta de material na 1^a, 3^a e na 6^a semana. Tudo documentado em prontuário médico (SAME) e no sistema de imagem integrado a colposcopia através de videocolposcópico (Programa “Software” Vídeo Diagnose®).

As biópsias, 1^a e 6^a semanas, foram realizadas com auxílio de pinças de Thomas Gaylor de 24 cm, 2 mm. Os fragmentos foram imersos em solução de formaldeído e encaminhados para estudo anátomo-patológico para avaliação da resposta ao tratamento.

4.3.1- IMAGENS DA COLPOSCÓPIA (2014-16).

Todas as imagens colposcópicas foram salvas em um banco de fotos no Laboratório de Colposcopia do Departamento de Ginecologia do Hospital de Clínicas.

Foram feitas no sistema de imagem integrado a colposcopia através de Videocolposcópio (Programa “Software” Vídeo Diagnose®).

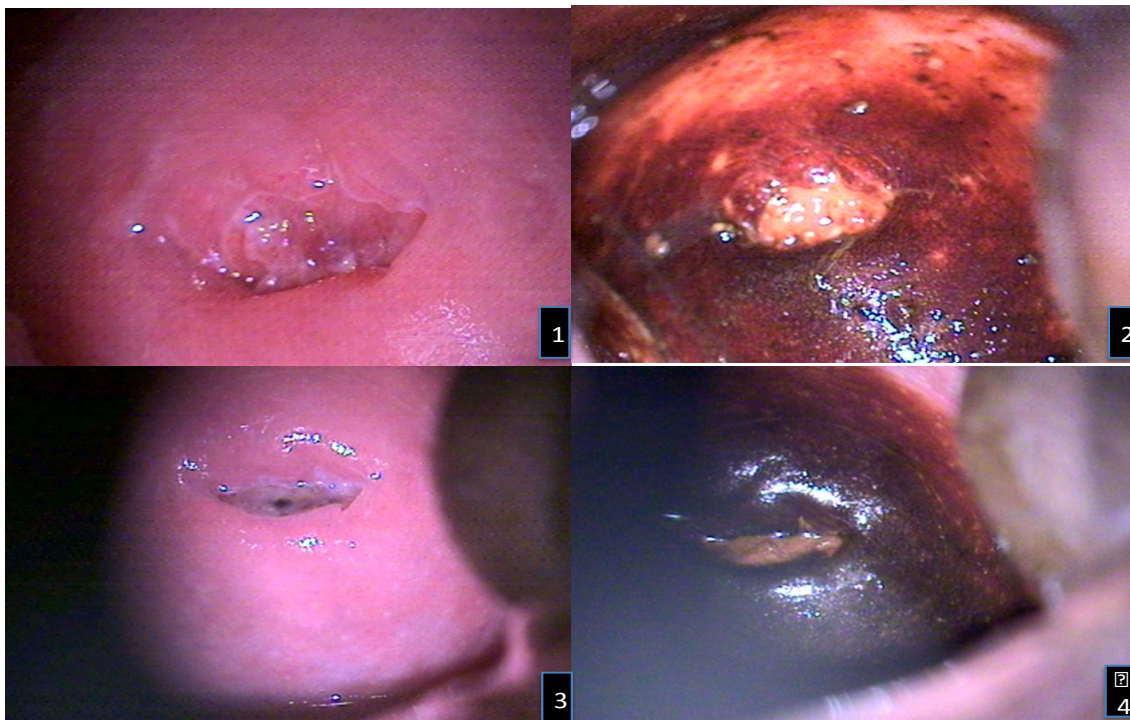


Figura 7: “Grupo Boa Resposta”: Visão Colposcópica direta com preparo do colo do útero, sem e com Lugol (Teste de Schiler). Observa-se Boa Resposta ao tratamento com IFN 2b Peguilado, sendo as imagens 1 e 2 pré-tratamento e 3 e 4 pós-tratamento. Visualiza-se a regressão da área Aceto Branco e Teste de Schiler positivo.



Figura 8: “Grupo Boa Resposta” Visão Colposcópica direta com preparo do colo do útero, sem e com Lugol (Teste de Schiler). Observa-se Boa Resposta ao tratamento com

IFN 2b Peguilado, sendo as imagens 1 e 2 pré-tratamento e 3 e 4 pós-tratamento. Visualiza-se a regressão da área Aceto Branco e Teste de Schiler positivo.

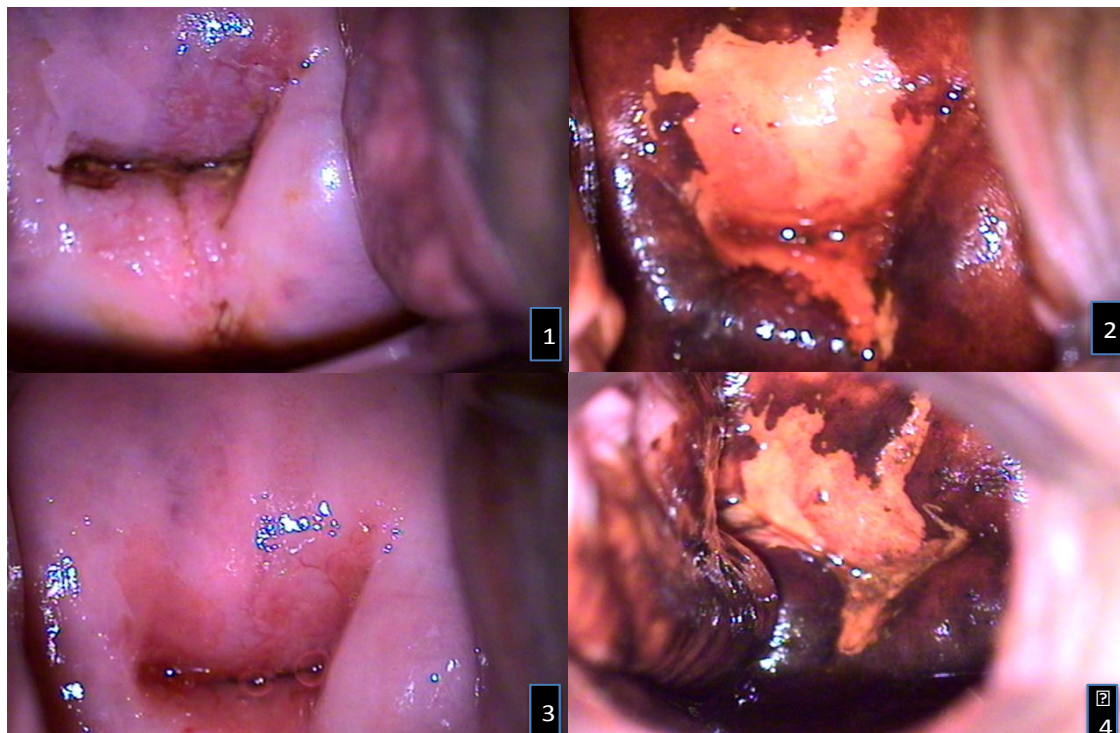


Figura 9: “Grupo Má Resposta” Visão Colposcópica direta com preparo do colo do útero, sem e com Lugol (Teste de Schiler). Observa-se Má Resposta ao tratamento com IFN 2b Peguilado, sendo as imagens 1 e 2 pré-tratamento e 3 e 4 pós-tratamento. Manteveram-se inalteradas. Áreas acebrancas sem regressão. Teste de Schiler negativo.

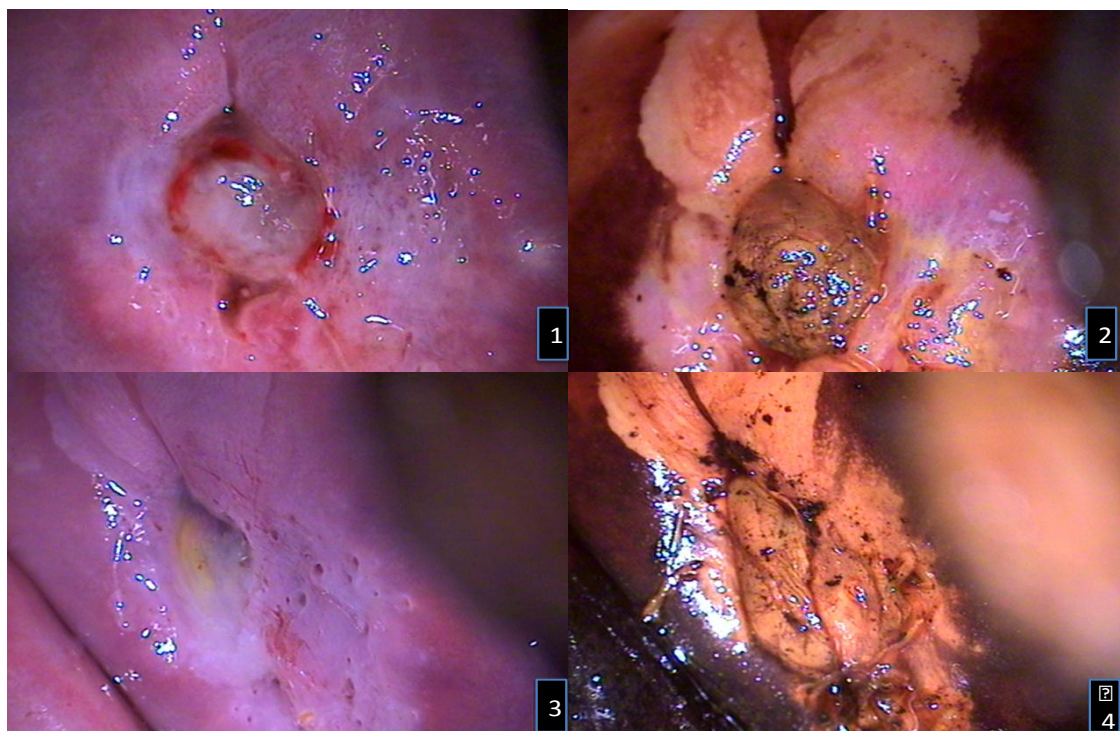


Figura 10: “Grupo Má Resposta” Visão Colposcópica direta com preparo do colo do útero, sem e com Lugol (Teste de Schiler). Observa-se Má Resposta ao tratamento com

IFN 2b Peguilado, sendo as imagens 1 e 2 pré-tratamento e 3 e 4 pós-tratamento. Manteve-se inalteradas. Áreas acebrancas sem regressão. Teste de Schiler negativo.

4.4 ANÁTOMO-PATOLÓGICO

Foi realizado estudo anátomo-patológico dos fragmentos de biópsia de colo uterino embebidos em parafina, pelo Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital Escola-UFTM. Todos os dados clínicos, laboratoriais e histológicos tanto da 1ª quanto da 6ª biópsia foram devidamente arquivados em banco de dados específico para o estudo e analisados conjuntamente na resposta final de cada paciente submetidas ao tratamento.

4.5 DADOS CLÍNICOS

As informações clínicas, tais como o histórico de cada paciente, foram obtidos da revisão dos prontuários médicos. Dados como o passado obstétrico, sorologias, idade, doenças de base, medicações, entre outros, foram observadas antes do tratamento. A cada aplicação semanal do IFN, as pacientes eram vistas e acompanhadas com anamnésia médica e anotadas em prontuário.

4.6 COLETA DO SANGUE PERIFÉRICO

As pacientes selecionadas para este trabalho foram submetidas a coleta de sangue periférico através de punção venosa superficial de vasos em membros superiores com o uso de escape nº 23. As amostras eram identificadas pelo Nome e RG do Hospital de Clínicas. Após a coleta, o material era acondicionado em estantes e armazenado sob refrigeração.

O sangue era acondicionado em tubos e em seguida identificado, garantindo assim maior confiabilidade nas amostras colhidas. Logo em seguida o material era transportado ao laboratório (IPON).

4.7 METODOLOGIA

4.7.1 ELISA

As citocinas presentes no soro das pacientes, previamente identificadas, foram dosadas pelo método ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) tipo sanduíche, utilizando pares de anticorpos monoclonais comerciais disponíveis da BD OptEIA™. Foram analisadas as citocinas (IL-1 β , IL-2, IL-12, TNF, IFN- γ , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10).

Os ensaios foram realizados seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Para tanto, foram utilizadas placas com 384 poços de fundo chato sensibilizadas com 25 μ l de anticorpos monoclonais específicos para a captura da citocina. Posteriormente a cada poço foi adicionado 25 μ l de citocina padrão recombinante seguindo diluições seriadas 1:2 com solução base seguindo as concentrações iniciais indicadas para cada citocina.

Nas outras fileiras foram adicionados 25 μ l por poço de amostra de soro das pacientes. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 2 horas e posteriormente lavadas por cinco vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) + Tween 20%. Logo em seguida foram adicionados 25 μ l por poço do anticorpo detector da citocina a ser dosada.

As placas foram incubadas novamente por 1 hora em temperatura ambiente e novamente lavadas por cinco vezes com PBS + Tween 20 %. Na etapa seguinte foram adicionadas 25 μ l/poço de TMB Substrato Reagente Set (BD 23 OptEIA™) com incubação de 30 minutos e em seguida foram adicionados 12,5 μ l/poço de ácido fosfórico para bloqueio da reação. Após adição do ácido fosfórico a leitura da placa de Elisa foi realizada através do leitor automatic Spectramax 384 Plus, sendo os resultados obtidos pela diferença entre as absorvâncias 450 e 570nm.

A concentração de citocinas encontrada foram determinadas em pg/ml através da comparação com as absorvâncias obtidas em uma curva padrão da respectiva citocina recombinante a ser realizada simultaneamente.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Através da análise dos dados obtidos e armazenados pelo método ELISA, com a dosagem sérica de citocinas colhidas de forma seriada, obtivemos quatro tabelas que mostram a evolução do tratamento sendo que algumas pacientes responderam bem enquanto que outras mantiveram o mesmo diagnóstico. Em um total de 17 pacientes, na Tabela 4, verifica-se 4 pacientes com NIC II (24%) contra 13 com NIC III (76%) figura 5. Já na Tabela 5, completa, com todos os dados pré e pós tratamentos, temos uma melhor avaliação do tratamento, podendo dividi-las em pacientes com boa e má resposta. Para tanto, fez-se o uso da média Wilcoxon Matched Paires Test e Mann Whitney test pelo software GraphPad Prism 6[®], e os valores observados a significância com p menor que 0,05 ($p < 0.05$).

Tabela 3 - Diagnóstico e número de pacientes inicialmente selecionadas para o estudo.

Diagnóstico	Pacientes	Número (n)
NIC II	4	n=4
NIC III	13	n=13
Total	17	n=17

Fonte: Do Autor, 2016

NÚMERO DE PACIENTES

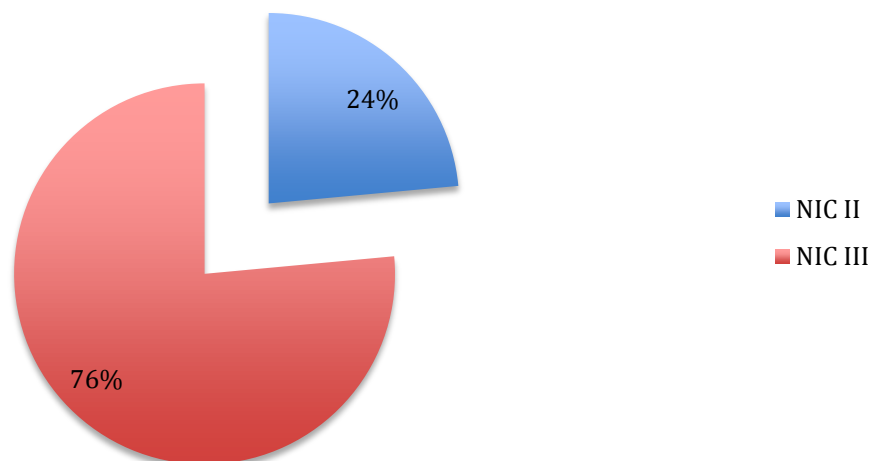


Figura-11 Distribuição dos Pacientes conforme a lesão inicial.

Tabela 4- Diagnóstico Inicial e Final das biópsias de todas as pacientes e conduta tomada em cada caso, após o término do tratamento

Pacientes	Idade	Diagnóstico Inicial	Diagnóstico Final	Resposta/Falha	Conduta
1	38	NIC III	NIC I/HPV	BOA RESPOSTA	SEGUIMENTO

2	34	NIC II	NIC II	SEM RESPOSTA	CAF/LEEP
3	47	NIC III	CERVICITE CRÔNICA/ METAPLASIA	BOA RESPOSTA	SEGUIMENTO
4	60	NIC III	NIC III	SEM RESPOSTA	CAF/LEEP
5	32	NIC III	NIC III	SEM RESPOSTA	CONIZAÇÃO
6	82	NIC III	NIC III	SEM RESPOSTA	CONIZAÇÃO
7	37	NIC II	NIC II	SEM RESPOSTA	CAF/LEEP
8	34	NIC III	NIC II/HPV	BOA RESPOSTA	CAF/LEEP
9	33	NIC III	NIC III	SEM RESPOSTA	CONIZAÇÃO
10	26	NIC III	HPV	BOA RESPOSTA	SEGUIMENTO
11	18	NIC II	NIC II	SEM RESPOSTA	CAF/LEEP
12	35	NIC III	NIC III	SEM RESPOSTA	CAF/LEEP
13	36	NIC III	CERVICITE CRÔNICA LEVE/ ESCAMOSA	BOA RESPOSTA	SEGUIMENTO
14	42	NIC III	NIC II/ HPV MUCOSA	BOA RESPOSTA	CAF/LEEP
15	54	NIC III	ESCAMOSA/ HPV	BOA RESPOSTA	SEGUIMENTO
16	28	NIC II	CERVICITE CRÔNICA ESCAMOSA	BOA RESPOSTA	SEGUIMENTO
17	35	NIC III	NIC III	SEM RESPOSTA	CAF/LEEP

Fonte: Do Autor, 2016

5- RESULTADOS

5.1- DIRECIONAMENTO DO ESTUDO.

A Tabela 4, mostra o panorama geral de todas as pacientes pré e pós tratamento, com as suas respectivas respostas. Foram colocadas em ordem cronológica de diagnóstico e tratamento as quais foram submetidas. Ao término do tratamento, as pacientes com ou sem resposta, voltaram a seguimento colposcópico de origem e foram submetidas as condutas preconizadas pelo serviço de Onco-Colposcopia da UFTM. As que tiveram uma boa resposta, foram para o seguimento cito-colposcopia de 6/6 meses e, as que não tiveram resposta adequada, foram indicadas procedimentos como CAF/LEEP (Ambulatorial) ou Conização (Bloco Cirúrgico). Todos realizados nas dependências do Hospital de Clínicas da UFTM.

Tendo por base os resultados obtidos durante a evolução como também a regressão das lesões, podemos enquadrar as pacientes em dois grupos: “Grupo 1” - as que tiveram boa resposta ao tratamento com IFN 2b peguilado e “Grupo 2” - as que não responderam ao tratamento proposto (falha terapêutica). Disponibilizamos para tanto de duas tabelas, Tabela 5 e Tabela 6, respectivamente, com o número de pacientes e as suas repostas. Nessas tabelas temos o diagnóstico inicial e ao final do tratamento.

Tabela 5- Relação das pacientes selecionadas do “Grupo Boa Resposta”.

Paciente	Diagnóstico Pré-tratamento	Diagnóstico Pós-tratamento
1	NIC III	NIC I/HPV
3	NIC II	CC / MI ¹
8	NIC III	NIC II/HPV
10	NIC III	HPV
13	NIC III	CC / MI ¹
14	NIC III	NIC II/ HPV
15	NIC III	HPV / ME ²
16	NIC III	CCL / MEM ³

Fonte: Do Autor, 2016

¹Cervicite crônica/metaplasia imatura

² Mucosa escamosa

³Cervicite crônica leve/Metaplasia escamosa madura

A Tabela 5, “Grupo Boa Resposta” com um total de 8. Dessas que tiveram boa resposta, 2 evoluíram para CAF/LEEP por regredirem de NIC III para NIC II e 1 paciente, lesão de baixo grau (NIC I), seguimento ambulatorial de 6/6 meses.

Tabela 6- Relação das pacientes selecionadas com “Grupo Má Resposta”.

Paciente	Diagnóstico Pré-tratamento	Diagnóstico Pós-tratamento
2	NIC II	NIC II
4	NIC III	NIC III
5	NIC III	NIC III
6	NIC III	NIC III
7	NIC II	NIC II
9	NIC III	NIC III
11	NIC II	NIC II
12	NIC III	NIC III
17	NIC III	NIC III

Fonte: Do Autor, 2016

A Tabela 6, “Grupo Má Resposta”, incluiu 9 pacientes, nas quais se observou falha terapêutica e que, após o término do tratamento com IFN 2b Peguilado, foram submetidas a procedimentos cirúrgicos (CAF/LEEP ou Conização).

Número de Pacientes

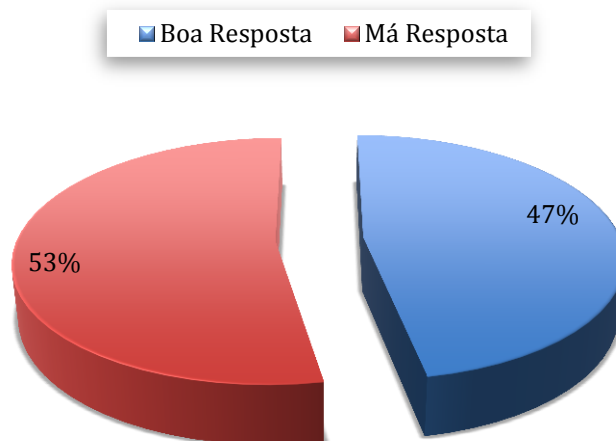


Figura-12. Representa a proporção de pacientes com Boa e Má Resposta.

Número de Pacientes

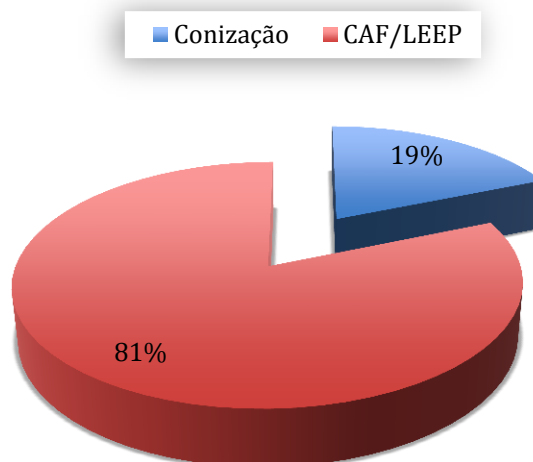


Figura-13. Representa a proporção de procedimentos realizados ao final do tratamento com as pacientes que persistiram com a lesão de alto grau tanto NIC II quanto NICIII.

TRATAMENTO COM IFN-2B

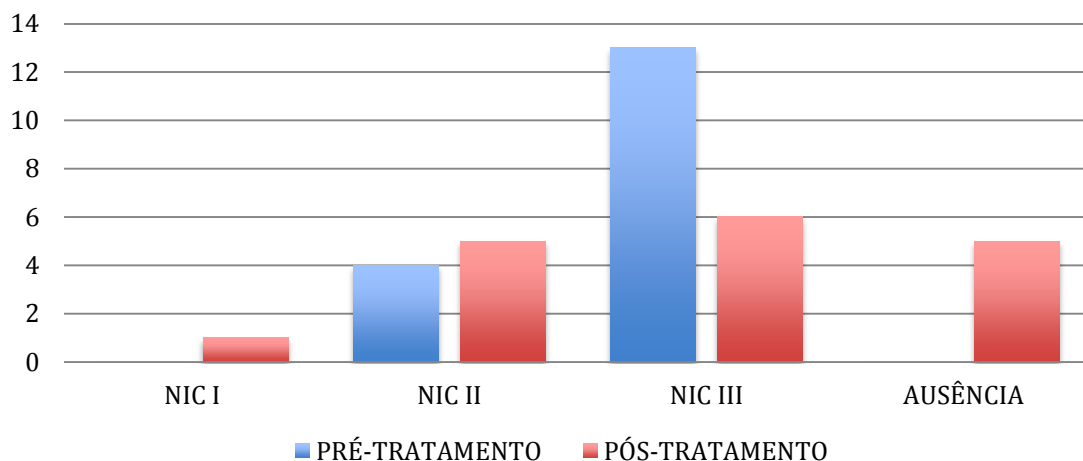


Figura-14. Representa a evolução diagnóstico do início ao final do tratamento.

5.2. ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DAS INTERLEUCINAS.

As figuras abaixo mostram as variações das Concentrações Séricas das Interleucinas colhidas das pacientes durante o estudo. Por meio de métodos estatísticos, através de gráficos, avaliou-se a Média e a Mediana. Didaticamente foram separados em quatro grupos representados por letras de A-D:

- A: Grupo Amostra Geral;
- B: Grupo Boa Resposta;
- C: Grupo Má Resposta;
- D: Grupo Boa X Má Resposta

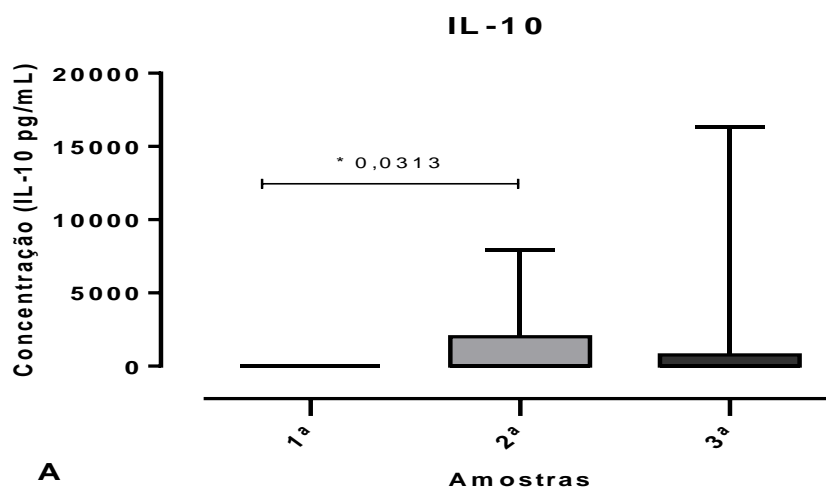


Figura 15: Concentração Sérica da IL-10 Amostra Geral A) Concentração da IL-10 nas amostras de soro colhidas de todos os pacientes em um total de 3 amostras durante o tratamento com IFN 2b Peguilado.

Na figura acima, na Amostra Geral, pelo método de Kruskal-Wallis test, as concentrações da IL-10 apresentaram significância estatística $p=0,0337$. Avaliando-se por outro método, Wilcoxon matched-pairs signed rank test, as concentrações apresentaram entre a 1ª e a 2ª colheita de amostra uma significância estatística $*p=0,0313$. Fato que não foi observado quando se compara a 1ª e a 3ª ou entre a 2ª e 3ª amostra pelo mesmo teste.

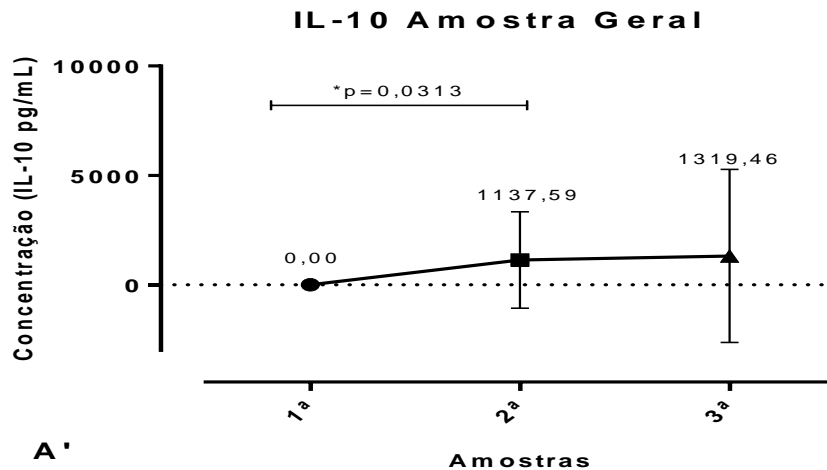


Figura 16: 1 A’): Média e Tendência do IL-10 na Amostra Geral. A’) O Gráfico das médias e tendências da IL-10. O aumento da concentração da interleucina IL-10, observado sobretudo entre 1ª (0,00) para a 2ª (1137,59) amostras $*p=0,0313$.

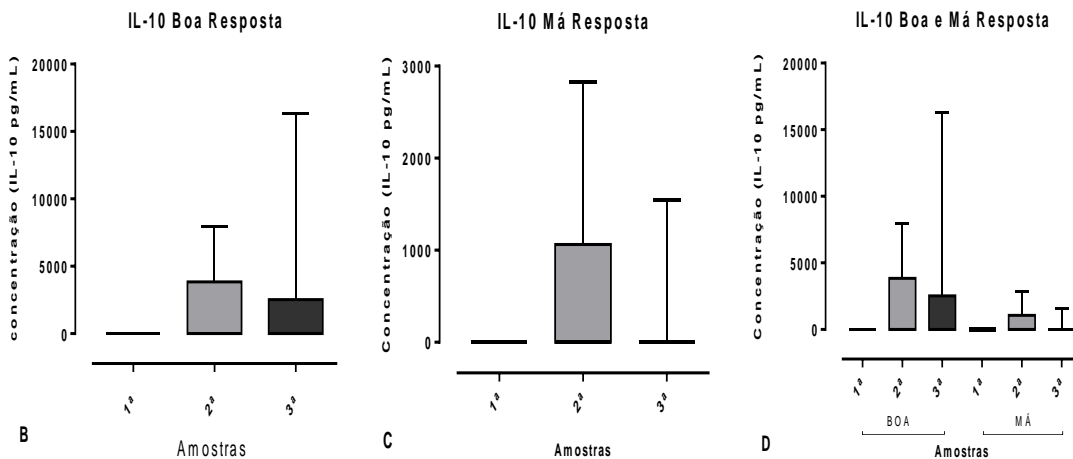


Figura 17: Concentração Sérica da IL-10 Boa e Má Resposta. Nesta figura a concentração da IL-10 avaliada em dois grupos, Boa (B) e Má Resposta (C) ao uso de IFN. Em ambos, com análise com Kruskal-Wallis test, sem significância estatística.

Analisando as amostras nos dois grupos de IL-10, as concentrações dos grupos **B** e **C**, não foram evidenciadas significâncias estatísticas entre eles como também no grupo **D**. No grupo de **B**, Kruskal-Wallis test $p=0,1545$ enquanto que **C** $p=0,1319$.

Quando analisamos as concentrações da IL-10 pelo método de Mann Whitney test não tivemos significância estatísticas, entre todas as relações de Boa e Má respostas. No grupo **D**, relação 1ª amostra Boa e Má Resposta Mann Whitney test $p>0,9999$; 2ª amostra $p=0,6769$ e na 3ª amostra $p=0,1353$.

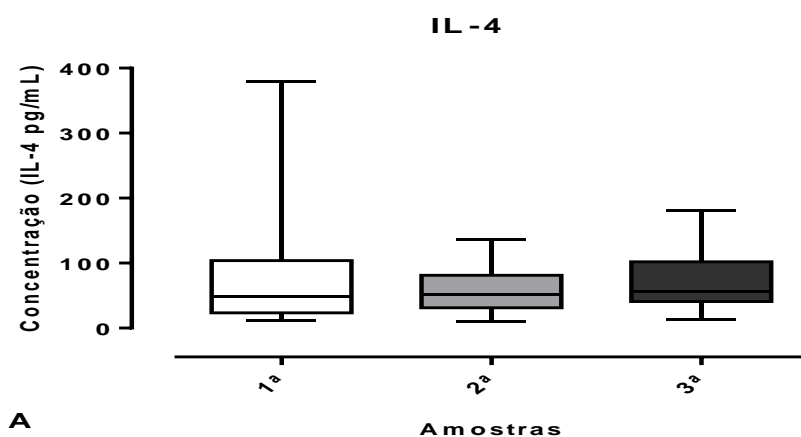


Figura 18: Concentração Sérica da IL-4 Amostra Geral. Nesta figura as concentrações da IL-4 durante as aplicações de IFN peguilhado 2b por seis semanas, através da coleta do soro 1ª, 2ª e 3ª amostras. Não houve significância estatística.

A IL-4 na Amostra Geral, na avaliação da concentração, não houve significância estatística Kruskal-Wallis test $p=0,8200$.

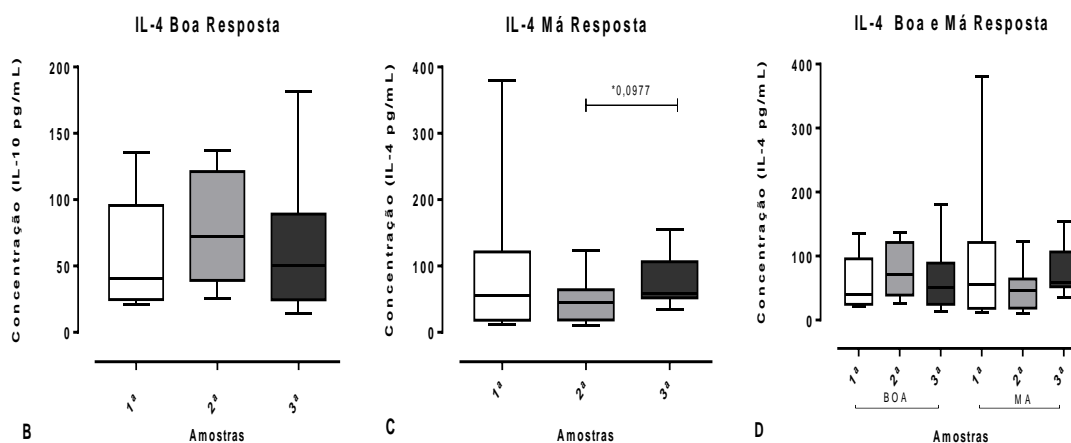


Figura 19: Concentração Sérica da IL-4 Boa e Má Resposta. Nesta figura a

concentração da IL-4 em dois grupos, B, C e D ao uso de IFN. Em ambos, com análise com Kruskal-Wallis test sem significância estatística.

Wilcoxon matched-pairs signed rank, a concentração de IL-4, não se observou significância estatística entre os grupos B e C.

Analisando pelo método Mann Whitney, o grupo D não se observou significância entre as concentrações, com 1ª amostra Boa e Má Resposta $p=0,7906$; 2ª amostra $p=0,1662$ e na 3ª amostra $p=0,3148$.

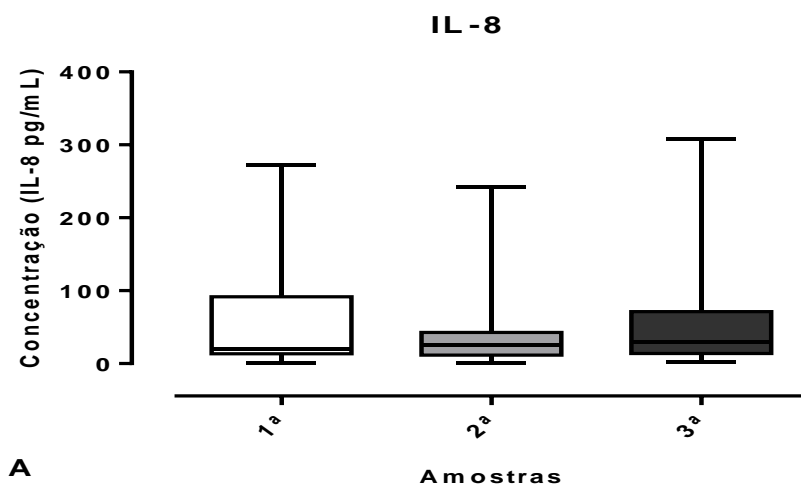


Figura 20: Concentração Sérica da IL-8 Amostra Geral. Avalia a Concentração da IL-8 entre as pacientes tratadas com IFN 2b Peguilado, nas 3 amostras colhidas do soro coletado durante as 6 aplicações. Na Amostra Geral sem significância estatística.

O gráfico, sem significância Estatística, Kruskal-Wallis test $p=0,8667$.

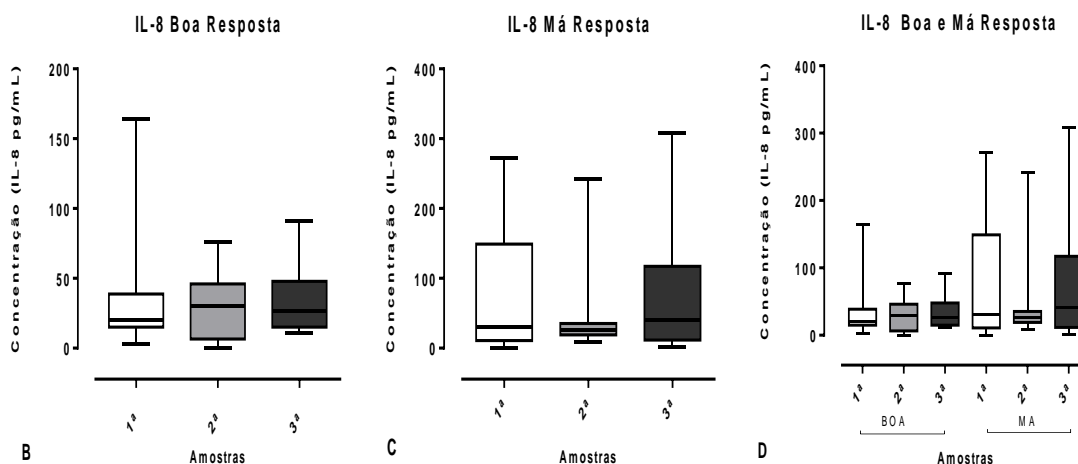


Figura 21: Concentração Sérica da IL-8 Boa e Má Resposta. Avalia a concentração da IL-8 em dois grupos, B, C e D ao uso de IFN. Em ambos, com análise Kruskal-Wallis test sem significância estatística.

Kruskal-Wallis test nas amostras do grupo **B** $p=0,9116$ e **C** $p=0,9468$.

Mann Whitney test no grupo **D** ausência de significância estatística. Na relação 1ª amostra Boa e Má Resposta Mann Whitney test $p=0,9336$; 2ª amostra Boa e Má Resposta $p=0,8619$ e na 3ª amostra Boa e Má Resposta $p=0,7214$.

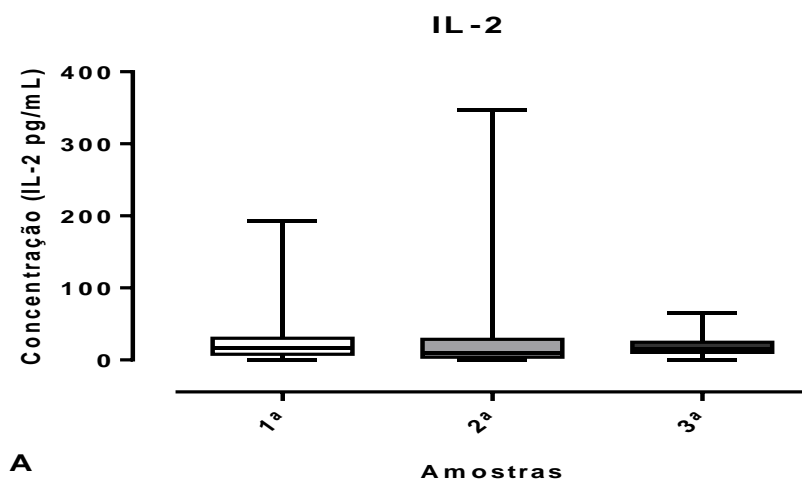


Figura 22: Concentração Sérica da IL-2 Amostra Geral. Grupo A) Concentração da IL-2 entre as pacientes tratadas com IFN 2b Peguilado, nas 3 amostras colhidas do soro durante as 6 aplicações.

Não houve significância estatística com Wilcoxon matched-pairs signed rank test e Kruskal-Wallis test com $p=0,2770$.

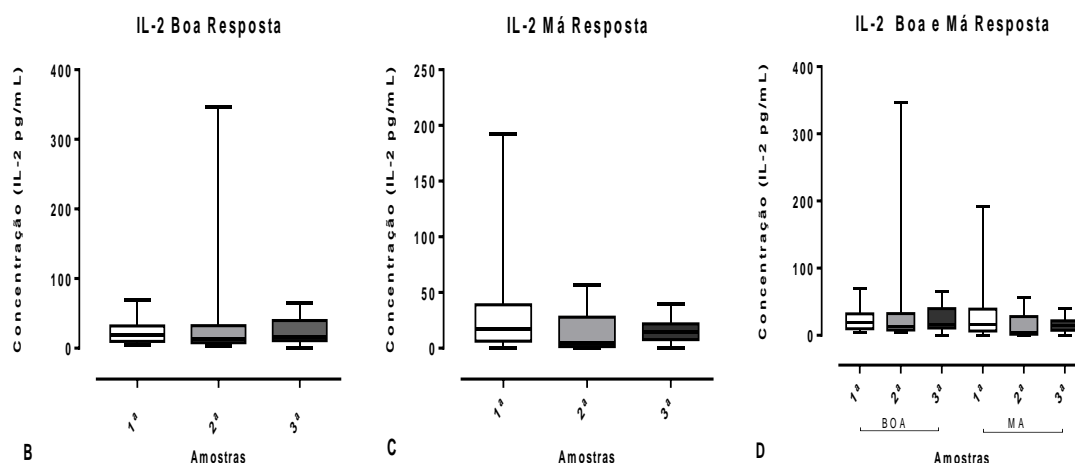


Figura 23: Concentração Sérica da IL-2 Boa e Má Resposta. Concentração da IL-2 em três grupos, B, C e D ao uso de IFN. Em ambos, com análise Kruskal-Wallis test sem significância estatística.

Amostras do Grupo **B** Kruskal-Wallis test $p= 0,7730$ e grupo **C** $p= 0,2743$.

Quando se compara no grupo D, Boas e Má resposta, Mann Whitney, não houve significância estatística. Na relação 1ª amostra Boa e Má Resposta ($p=0,7278$); 2ª amostra Boa e Má Resposta $p=0,1097$ e na 3ª amostra Boa e Má Resposta $p=0,4976$.

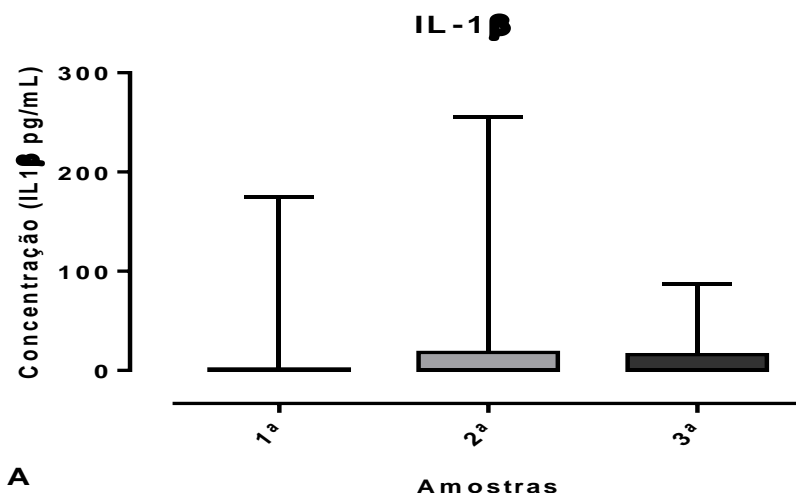


Figura 24: Concentração Sérica da IL-1 β Amostra Geral Grupo A) Concentração da IL-1 β entre as pacientes tratadas com IFN 2b Peguilado, nas 3 amostras colhidas do soro durante as 6 aplicações.

A concentração da IL-1 na Amostra Geral, não tivemos significância estatística com Kruskal-Wallis test $p= 0,7771$.

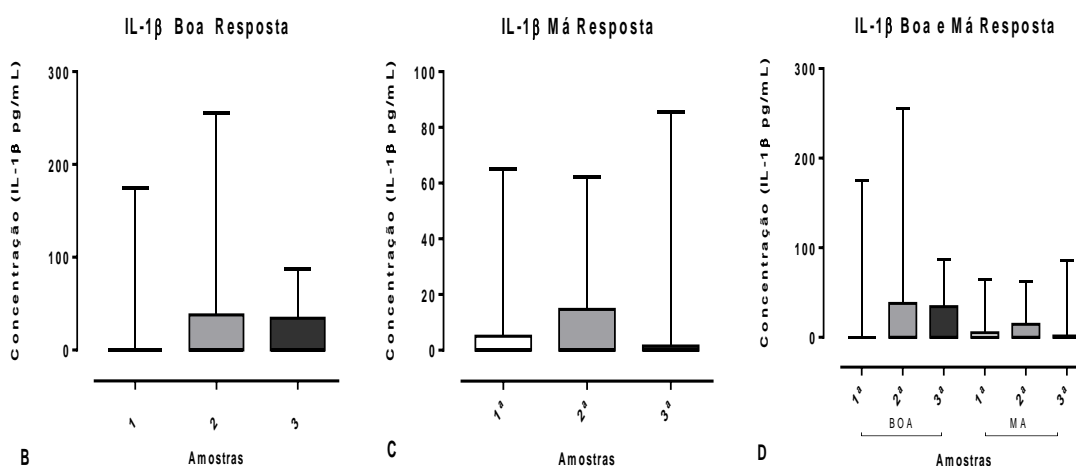


Figura 25: Concentração Sérica da IL-1 β Boa e Má Resposta: Concentração da IL-1 β em três grupos, B, C e D ao uso de IFN. Em ambos, com análise Kruskal-Wallis test sem significância estatística. Amostras no grupo **B** Kruskal-Wallis test $p= 0,5636$ e **C** $p= 0,8759$.

Quando comparamos as concentrações dos dois grupos (Boa e Má Resposta) **D não observamos** significância estatística. Na relação 1ª amostra Boa e Má Resposta Mann Whitney $p=0,5765$; 2ª amostra Boa e Má Resposta $p=0,7719$ e na 3ª amostra Boa e Má Resposta $p=0,4244$

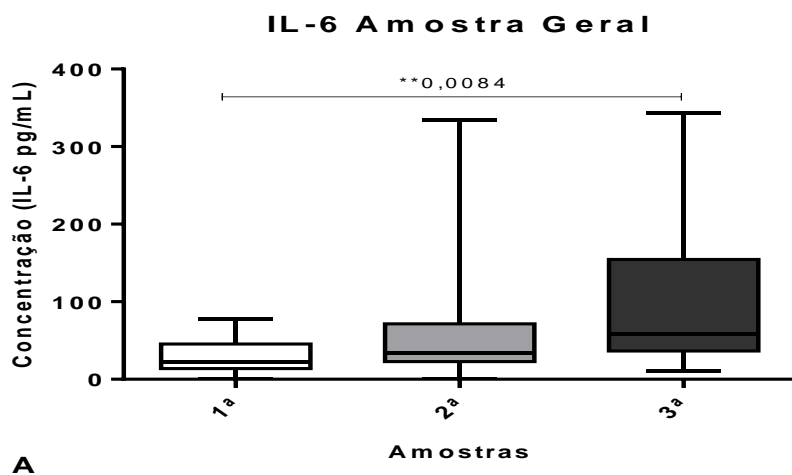


Figura 26: Concentração Sérica da IL-6 Amostra Geral. Grupo A) Concentração da IL-6 entre as pacientes tratadas com IFN 2b Peguilado, nas 3 amostras colhidas do soro durante as 6 aplicações. Significância estatística na amostra geral com $p=0,0241$.

No grupo **A**, observa-se significância estatística com $p=0,0241$ kruskal-Wallis test e entre a 1ª e a 3ª amostras mais evidente com $**p=0,0084$ Mann-Whitney test.

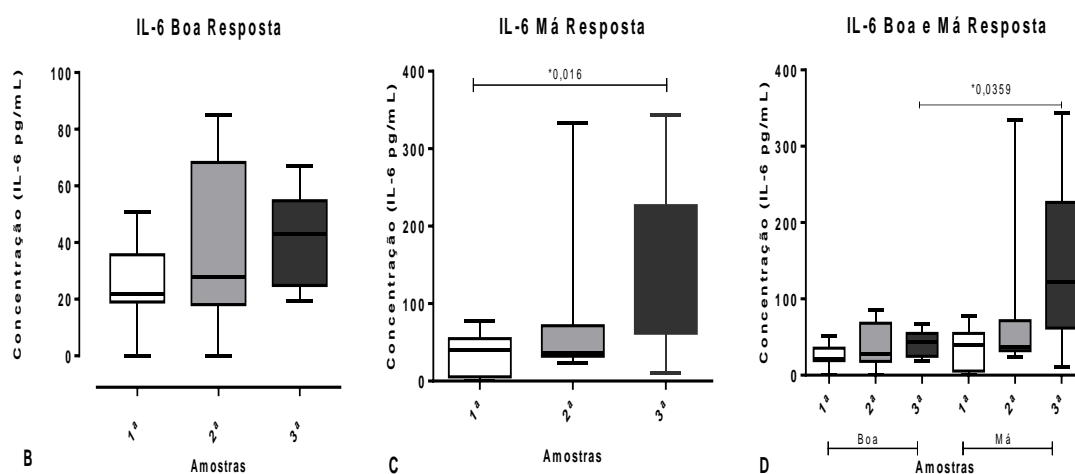


Figura 27: Concentração Sérica da IL-6 Boa e Má Resposta. Concentração de IL-6 em três grupos, B, C e D ao uso de IFN. Nas pacientes do grupo C houve significância estatística, fato também encontrado ao analisar o grupo D. Na amostra do grupo **C**, kruskal-Wallis test $p=0,0331$ e entre a 1ª para a 3ª amostra, uma significância estatística

com $*p=0,0106$ Mann-Whitney test. Pelo método Mann Whitney test grupo **D**, observa-se significância estatística com $p=0,0213$ entre a comparação das 3ª amostras do Grupo Boa e Má Resposta com $*p=0,0359$.

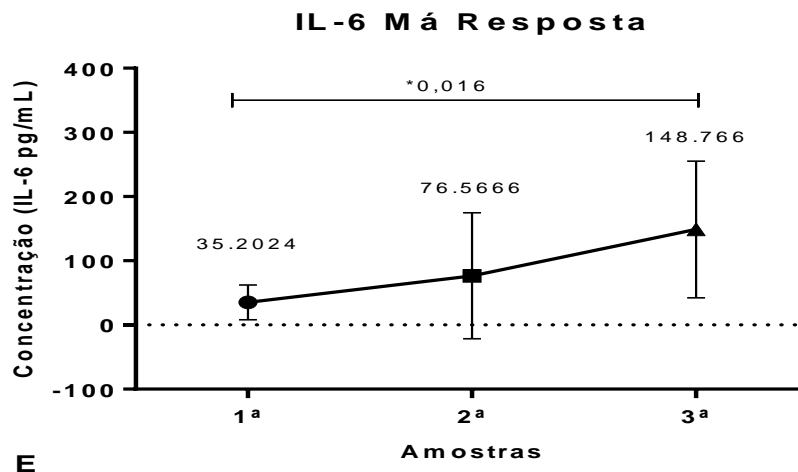


Figura 28: Média e Tendência da IL-6 Má Resposta Verifica-se um aumento da concentração da IL-6.

Neste gráfico, nas pacientes com Má Resposta, observa-se aumento da concentração da IL-6 com $p=0,0331$ kruskal-Wallis e $p=0,016$ Mann-Whitney entre 1ª e a 3ª amostra.

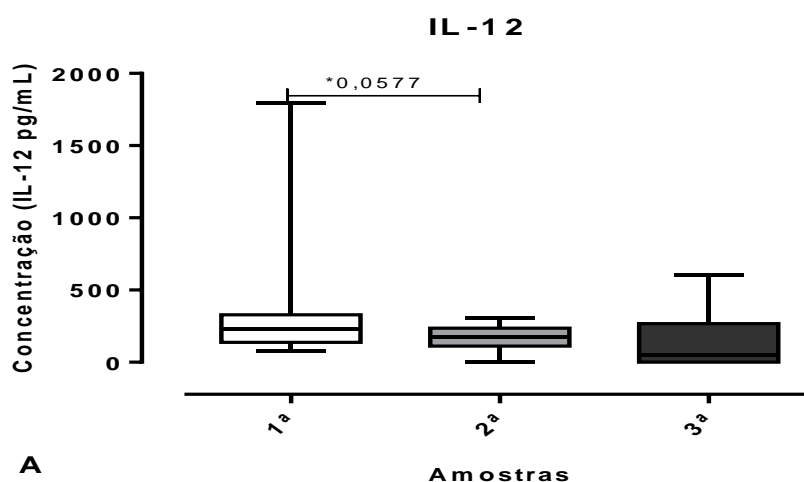


Figura 29: Concentração Sérica da IL-12 Amostra Geral. Grupo A) Concentração da IL-12 entre as pacientes tratadas com IFN 2b Peguilado, nas 3 amostras colhidas do soro durante as 6 aplicações. No grupo A, quando se avalia a concentração das amostras 1ª e 2ª, observa-se uma tendência estatística com $*p= 0,0577$ Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

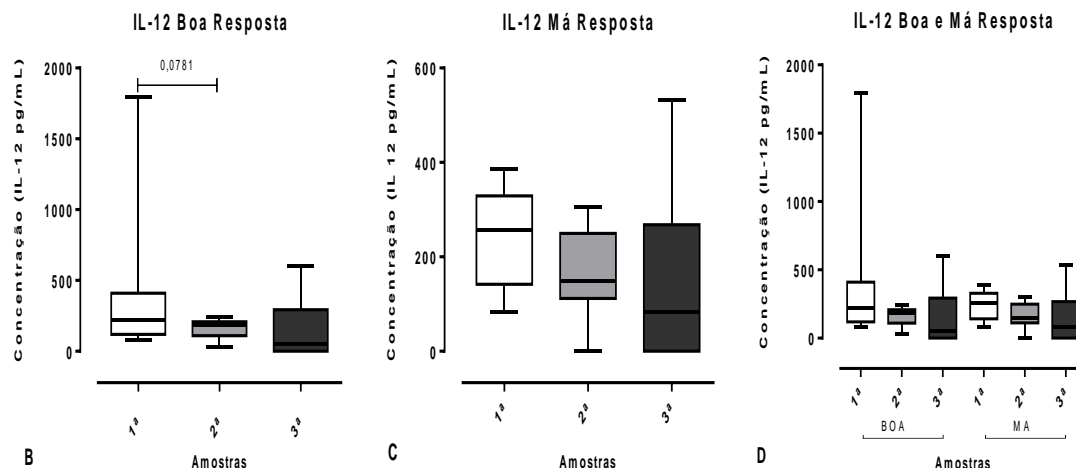


Figura 30: Concentração Sérica da IL-12 Boa e Má Resposta. Concentração da IL-12 em três grupos, **B**, **C** e **D** ao uso de IFN. Em ambos, com análise (Kruskal-Wallis test) sem significância estatística. No Grupo B, a concentração de IL-12 entre a 1^a e a 2^a amostra, apresentou $p=0,0781$ Wilcoxon matched-pairs signed rank.

Mann Whitney test no grupo **D** ausência de significância estatística. Na relação 1^a amostra Boa e Má Resposta $p=0,9319$; 2^a amostra Boa e Má Resposta $p=0,9826$ e na 3^a amostra Boa e Má Resposta $p>0,9999$.

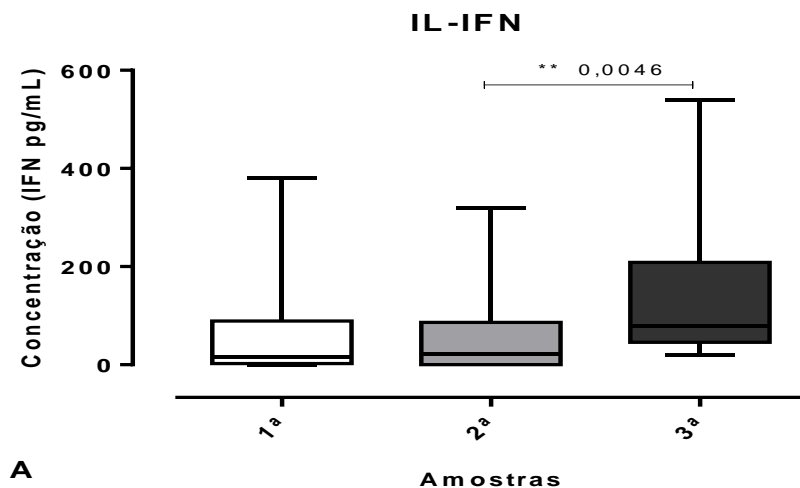


Figura 31: Concentração Sérica da IFN Amostra Geral. Grupo A) Concentração de IFN nas amostras colhidas de todos os pacientes tratadas com IFN 2b Peguilado, nas 3 amostras colhidas do soro durante as 6 aplicações. Com significância estatística. No grupo **A** Kruskal-Wallis test $p=0,0123$. Aumento na concentração de IFN, com um importante ganho estatístico entre a 2^a com a 3^a amostra Wilcoxon matched-pairs signed rank test $**p=0,0046$. Entre a 1^a com a 3^a amostra ausência de significância com $p=0,0887$.

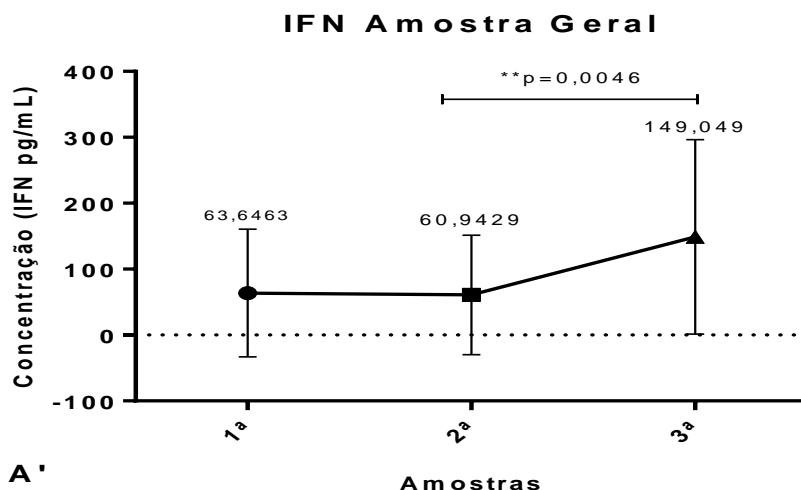


Figura 32: Média e Tendência do IFN na Amostra Geral. Verifica-se aumento da concentração da 2ª (60,9429 pg/ml) com a 3ª (149,049 pg/ml) amostra ****p=0,0046**.

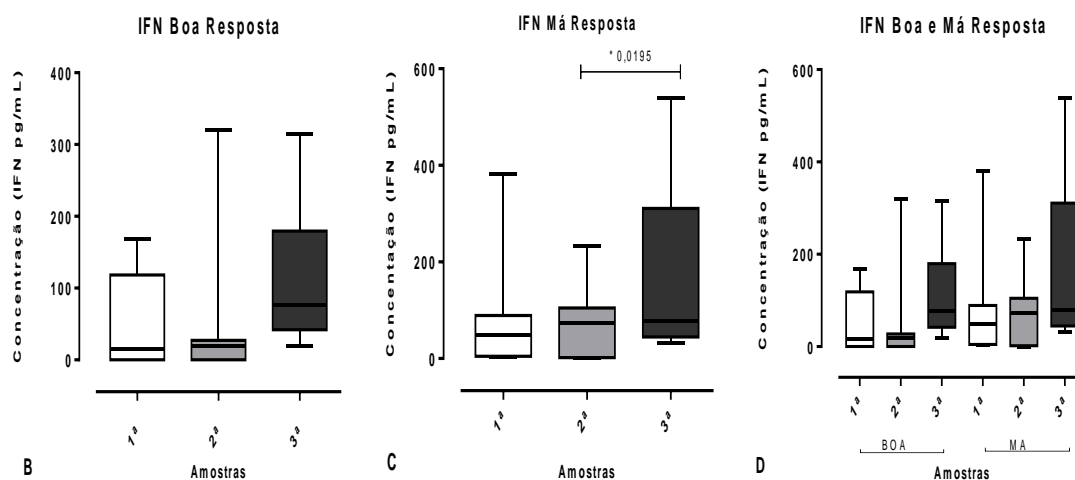


Figura 33: Concentração Sérica da IFN Boa e Má Resposta. Concentração de IFN em três grupos, **B, C e D** com uso de IFN.

No primeiro gráfico, grupo **B**, observa-se aumento da mediana, com um aumento da concentração do IFN com Kruskal-Wallis $p=0,0475$. Ao passo que, nas pacientes do grupo **C**, Má Resposta, observou-se aumento da concentração, com aumento da mediana, entre a 2ª com a 3ª amostra com Wilcoxon matched-pairs signed rank $*p=0,0195$.

No grupo **D** ausência de significância estatística. Na relação 1ª amostra Boa e Má Resposta $p=0,4791$; 2ª amostra Boa e Má Resposta $p=0,4170$ e na 3ª amostra Boa e Má Resposta $p=0,5893$ pelo Mann Whitney test

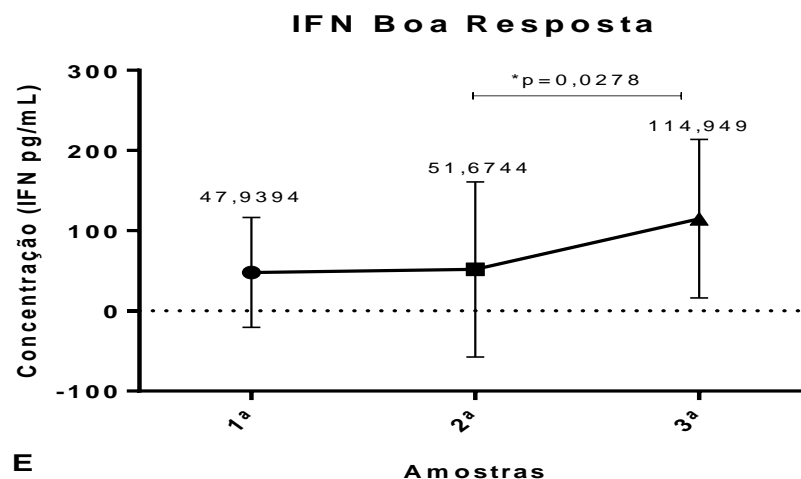


Figura 34: Média e Tendência do IFN Boa Resposta Verifica-se aumento da concentração da 2ª (51,6744 pg/ml) para a 3ª (114,949 pg/ml) amostra com significância * $p=0,0278$ Mann Whitney test.

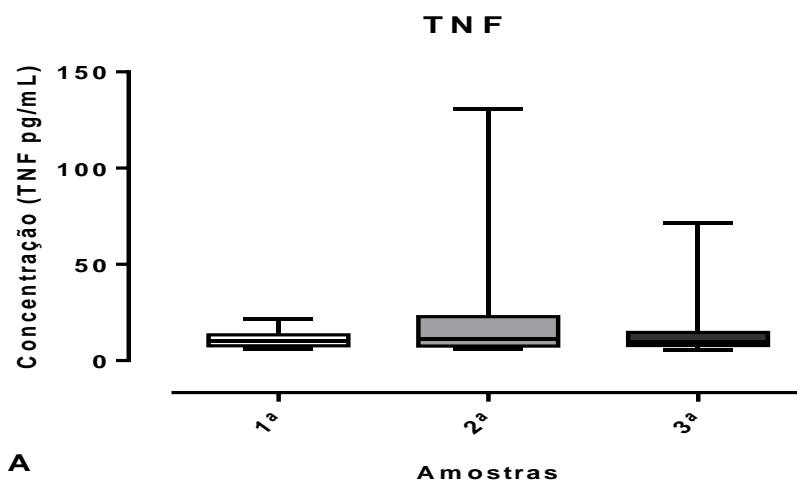


Figura 35: Concentração Sérica da TNF Amostra Geral. Grupo A) Concentração de TNF entre as pacientes tratadas com IFN 2b Peguilado, nas 3 amostras colhidas do soro durante as 6 aplicações.

Na avaliação das concentrações de TNF na Amostra Geral, não houve significância estatística com Wilcoxon matched-pairs signed rank test e Kruskal-Wallis test $p= 0,5889$.

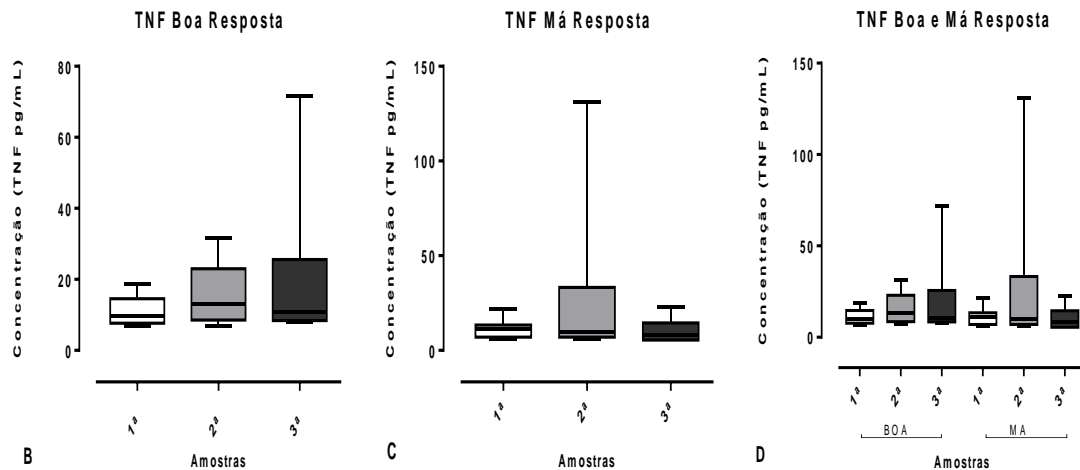


Figura 36: Concentração Sérica da TNF Boa e Má Resposta. Avalia a Concentração de TNF em três grupos, B, C e D ao uso de IFN. Em ambos, com análise Kruskal-Wallis test sem significância estatística. Kruskal-Wallis test nas Amostras do grupo B $p=0,4831$ e C $p=0,5426$. Mann Whitney test no grupo D ausência de significância estatística. Na relação 1ª amostra Boa e Má Resposta $p=0,9336$; 2ª amostra Boa e Má Resposta $p=0,5947$ e na 3ª amostra Boa e Má Resposta $p=0,1981$.

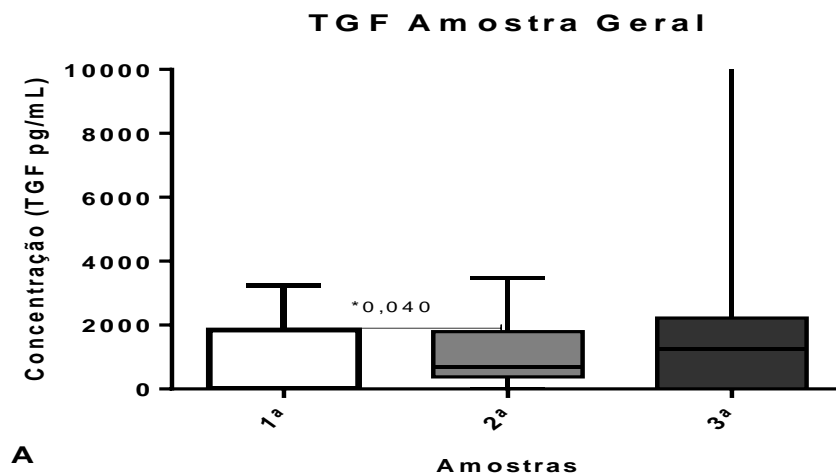


Figura 37: Concentração Sérica da TGF Amostra Geral. Grupo A) Concentração de TGF entre as pacientes tratadas com IFN 2b Peguilado, nas 3 amostras colhidas do soro durante as 6 aplicações.

Amostra geral, grupo A Kruskal-Wallis test $p=0,1143$. Entre a 1ª com a 2ª amostra, avaliando a concentração do TGF, houve significância estatística Mann Whitney $*p=0,0400$.

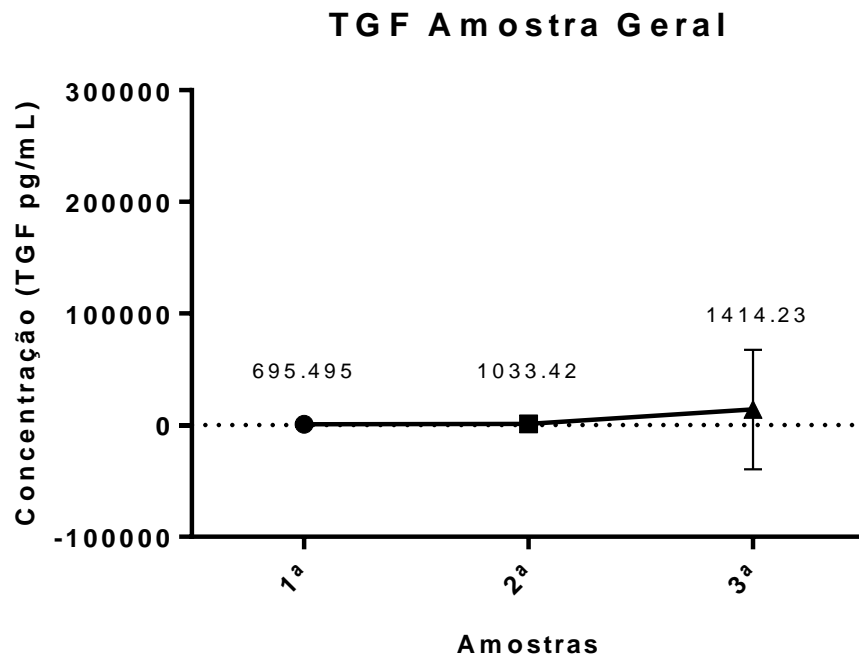


Figura 38: Média e Tendência do TGF na Amostra Geral. Verifica-se aumento da concentração da 1ª (695.495 pg/ml), 2ª (1033.42) até 3ª (1414,23 pg/ml).

Amostra geral sem significância estatística $p=0,1143$, porém quando se analisa a concentração da 1ª (695.495) com a 2ª (1033.42) evidencia significância estatística com $p=0,0400$.

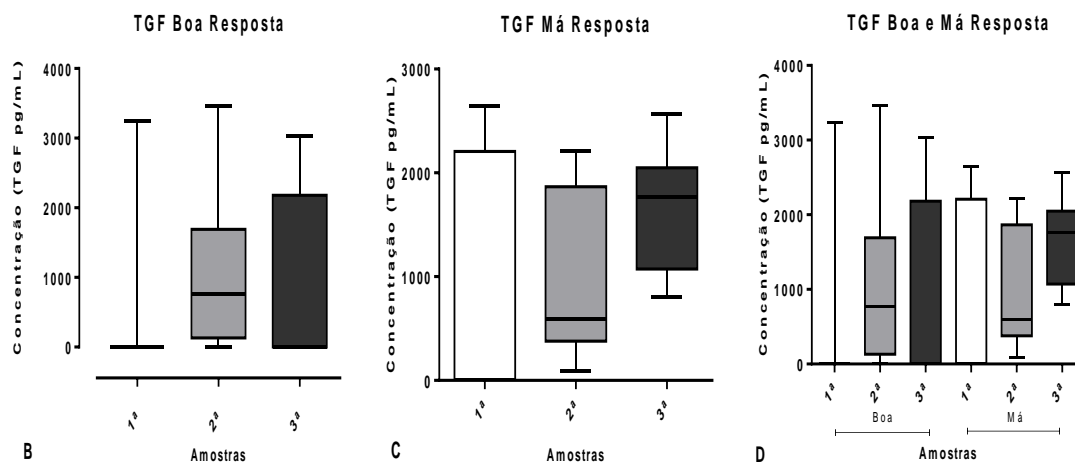


Gráfico 39: Concentração Sérica da TGF Boa e Má Resposta. Concentração do TGF em cada grupo, **B**, **C** e **D** com aplicação semanal do IFN 2b Peguilado.

No grupo **B**, sem significância estatística com Kruskal-Wallis test $p=0,0954$ e no grupo **C** Kruskal-Wallis test $p=0,2054$.

Mann Whitney test no grupo **D**, sem significância, 1ª amostra Boa e Má Resposta $p=0,2941$; 2ª amostra Boa e Má Resposta $p=0,9390$ e na 3ª amostra Boa e Má Resposta $p=0,0808$.

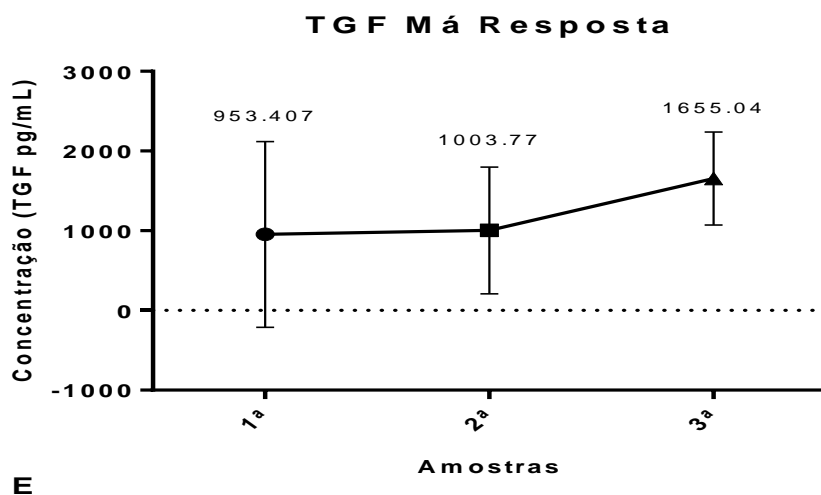


Figura 40: Média e Tendência do TGF Má Resposta. Verifica-se aumento da concentração da 1ª (953,407), 2ª (1.003,77 pg/ml) até 3ª (1655,04 pg/ml) amostra com $p=0,2054$.

6.0 DISCUSSÃO

Diante da eficácia do uso de interferon (IFN α -2b) intra-lesional demonstrada em alguns estudos como Murta e Tavares (2004); Misson (2010); Ramos (2010) optou-se então por fazer o uso de IFN 2b Peguilado subcutâneo por vários motivos e vantagens como a maior facilidade e compreensão das pacientes, sem necessidade de exposição do colo uterino, redução do número de doses semanais, comodidade posológica, maior assiduidade da paciente ao tratamento independente do período menstrual e maior controle da coleta do material.

Sabendo que os estágios pré-invasivos do câncer do colo uterino têm uma relação direta de fatores virais envolvidos ao nível molecular, o IFN serve como um bom modelo para investigar os tratamentos alternativos usando a imunoterapia. Assim, o nosso estudo visou avaliar a influência da terapia imunológica em pacientes com lesões de alto grau NIC II/III dosando e avaliando o comportamento das interleucinas no soro periférico de pacientes durante o tratamento com IFN 2b Peguilado.

Com a análise dos dados colhidos neste trabalho, com um grupo total (n=17) pacientes, todas com lesões de alto grau NIC II/III, tratadas com IFN Peguilado 2-b subcutâneo (periumbilical), tivemos 8 pacientes (47,05%) com boa resposta ao passo que 9 pacientes (52,95%) não responderam ao tratamento, na avaliação histológica das amostras. Foram avaliadas a expressão das citocinas: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF, IFN e TGF de uma forma geral como também em dois grupos: Boa e Má resposta. Tivemos respostas muito semelhantes quando comparadas aos trabalhos realizados anteriormente.

Avaliou-se as concentrações das citocinas no estudo separadamente em quatro grupos (A, B, C e D). O grupo A representou a concentração da citocina na Amostra Geral (com todas as pacientes); grupo B, pacientes que tiveram Boa Resposta; grupo C, Má Resposta e grupo D a relação entre os grupos B e C.

De uma forma geral, observou-se que, que algumas citocinas com perfil Th1 tiveram aumento na concentração nas pacientes com “Boa Resposta” o que por outro lado, nas pacientes do grupo “Má Resposta”, um aumento de algumas citocinas perfil Th2. (Clerici M, 1994) já descrevia um aumento da secreção de citocinas de padrão Th2 e redução de citocinas de padrão Th1 em pacientes com lesões de alto grau.

Diante das citocinas avaliadas em nosso estudo, como de esperado em outras análises, houve um aumento progressivo da síntese de IFN- γ pelos linfócitos T auxiliares no soro após uso de IFN 2b Peguilado. Esta é uma importante citocina responsável para a indução de um perfil de resposta imunitária celular através do aumento da atividade de macrófagos e por induzir mecanismos de amplificação e evolução do Linfócito CD4+ para o perfil Th1.

Em alguns trabalhos como (Lee Bn et. al., 2004) encontraram menor proporção de células T CD4 que produziam IL-2, IFN- γ e TNF- α em lesões de alto grau quando comparadas com um grupo controle. Estes autores também observaram que pacientes com ASCUS, LSIL e HSIL tinham uma porcentagem menor de células T CD8 que produziam IL-2 quando comparadas ao grupo controle.

Bais et. al., (2007) encontraram mudanças no padrão das citocinas em relação ao

perfil Th2 a medida que a lesão se agrava NIC II para NIC III em concordância com outros autores. Sharma A et. al., (2007) também mostraram uma mudança do padrão de resposta imunológico em direção ao perfil Th2 a medida que a doença se agrava.

Outros trabalhos (El-Sherif, A.M, et. al., 2001) têm demonstrado que a progressão das lesões, em doentes com lesões de alto grau NIC II/NIC III, está relacionada com uma redução sistêmica das interleucinas tipo Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-2).

Em nosso estudo, as interleucinas IL-10 e TGF observamos uma significância estatística na amostra geral e especificamente na TGF com um aumento nas pacientes com má resposta o que reforça a hipótese de que o tumor quando não evolui de forma favorável, caminha para a resposta Th2. Roteli-Martins, et. al., (2009), em um estudo coorte, avaliaram a expressão da IL-10 em lesões do colo uterino. Observou-se a existência de fatores que implicavam no resultado da infecção HPV induzindo ou não a progressão da doença para NIC e chegaram a conclusão que a IL-10 pode desempenhar um papel importante na criação de um microambiente que favoreça a progressão da doença cervical.

A IL-4, considerada um dos principais estímulos para desenvolvimento de células Th2, pode antagonizar os efeitos ativadores de IFN sobre os macrófagos e, desse modo, inibir reações imunes mediadas por células (Abbas & Litchman, 2005). Em nossa estudo, não houve significância estatística. (Sharma et. al., 2007) fizeram um estudo de coorte que avaliou a produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico de mulheres que possuíam câncer do colo uterino e neoplasia intraepitelial (baixo e alto grau), sendo 60 mulheres com câncer, 35 NIC e 30 controles e, observaram que, entre as pacientes com câncer do colo uterino e NIC III, estavam aumentados os níveis de IL-4 e IL-10 quando comparados aos casos controle e NIC de baixo grau, indicando haver agravamento da doença.

Clerici et al., (1997); Seo et al., (2001), sugerem que o aumento da produção de IL-10 seria um mecanismo usado por células tumorais para escapar do reconhecimento do sistema imune. Em nossa análise, a IL-10, apresentou significância estatística na amostra geral com $p=0,0337$ e mais fortemente evidenciado quando se compara a 1ª com a 2ª amostras com $p=0,0313$. Segundo (Bais et. al., 2005), a resposta imune nas pacientes com lesões de alto grau, o perfil de resposta da IL-10 é predominantemente

imunoinibitório e supressor, com um aumento nas concentrações, já que é observado uma alteração na imunovigilância, favorecendo progressão das lesões e para o câncer cervical.

Ao analisarmos a IL-2, não obtivemos valores significativos, tanto na Amostra Geral quanto no comparativo de Boa e Má Resposta. Em um estudo, caso-controle Mindiola R, et. al., (2007), determinaram a expressão de IL-2 em diferentes graus de Neoplasia Intraepithelial Cervical NIC I/ II/ III, e sua relação com os níveis séricos desta citocinas e o estado da infecção pelo vírus HPV, tendo encontrado aumento da concentração de IL-2 e IL-2R em cérvix uterina de pacientes com NIC associado ao grau da lesão e isso poderia estar condizente com a progressão da neoplasia intraepitelial.

Trabalhos como de Bais et al., (2007); Lee et al., (2004); El-sherif et al., (2001) observaram uma diminuição da concentração de interleucinas Th1 (IFN, TNF e IL-2) quando se caminhava para lesão de alto grau. Em contraste, em nosso estudo, observamos. Um aumento da expressão do IFN, tanto na “Amostra geral” quanto na “Boa resposta” (grupo B), o que era de esperar já que induz o perfil Th1. Os resultados obtidos na aAmostra geral teve significância estatística * $p=0,0123$ como também nas pacientes com Boa resposta * $p=0.0475$.

Outro dado importante, ainda a respeito do IFN, quando comparamos as pacientes do grupo C, “Má Resposta”, entre 2ª e a 3ª amostras observa-se significância estatística * $p=0,0195$. Isso pode ser visto em outras análises feitas em outros trabalhos como (Pardo-Govea, et. al., 2005) os quais encontraram elevadas taxas de IFN em pacientes com lesão cervical de alto grau quando comparadas aos controles. Assim, nesse mesmo estudo observou-se a existência de uma relação direta entre a progressão da lesão e o aumento do IFN. A super-expressão dessa citocina pode ser devido a uma resposta das células cervicais a gravidade da lesão, o que sugere que o perfil Th1 seria o tipo de resposta das células cervicais anormais, em reação a presença do HPV. Estes dados corroboram com os reportados por outros autores como Scott, Stites E Moscicki (1999).

Porém, (Pao, C.C., et. al. 1995) já evidenciava que uma redução na expressão do

IFN poderia influenciar nos mecanismos inflamatórios e imunológicos no câncer cervical. Watanabe, Y. & Jacob, (1991), em estudos *in vivo* já sugeriram que TNF e IFN são dependentes do estágio de diferenciação e maturação celular como por exemplo o TNF que podem tanto aumentar quanto inibir a expressão de moléculas HLA de classe II induzida por IFN.

Quanto a IL-6, na amostra Geral, observa-se significância estatística com $p=0,0241$ e entre a 1ª e a 3ª amostras mais evidente com $**p=0,0084$. Na amostra do grupo C, má resposta, $p=0,0331$ e entre a 1ª para a 3ª amostra, uma significância estatística com $*p=0,0106$. Valores semelhantes foram observados por (PARDO-GOVEA, T.; CALLEJAS, D.; NÚÑEZ-TROCONIS, J.; ARAUJO, M.; COSTA, L.; PONS, H.; DELGADO, M.; MONSALVE, 2005) com elevação da concentração de IL-6 em pacientes com lesão em colo uterino e em pacientes com lesões pré-malignas de alto grau (Al-Saleh W, et. al., 1998).

Quando avaliado a IL-8, não foi obtida significância estatística em nossas análises, tanto na amostra geral quanto analisados separadamente. Alguns estudos, (Kemp Tj e. al., 2010) mostraram aumento da concentração de IL-8 no sangue periférico em pacientes com lesão de alto grau, demonstrando baixa resposta linfoproliferativa e persistência viral. (TAVARES-MURTA et al., 2008) em seus trabalhos, mostraram níveis elevados de IL-8.

Quando avaliamos a IL-12 observamos uma tendência estatística tanto na amostra geral ($p=0,0577$) quanto nas pacientes com boa resposta ($p=0,0781$). Estes resultados corroboram a de alguns autores já que IL-12 induz a produção de IFN pelos macrófagos, proliferação e atividade citolítica de NK e células TCD8+, além de ter atividade antiangiogênica mediado pelo IFN, prevenindo portanto, infecções virais, progressão tumoral e inibição da atividade metastática (DEL VECCHIO, M.; BAJETTA, E.; CANOVA, S.; LOTZE, M.; PARMIANI; ANICHINI, 2007).

Ao analisarmos a IL-1 β não obtivemos significância estatística na avaliação da amostra geral quanto nas pacientes com Boa e Má respostas. Outros autores (Niebler et. al., 2013), avaliaram a resposta imune anti-viral precoce da IL-1 β , que é um fator

importante para o início da inflamação e ativação de células imunes, tais como macrófagos e células T na resposta Th1, e observaram que a E6 potencializa a degradação da IL-1 β , fugindo da resposta citotóxica, favorecendo a progressão da lesão cervical. Sabe-se que o HPV, através de suas oncoproteínas E6 e E7 interagem e induzindo a degradação de p53 (reguladores do ciclo celular) e a pRb, imortalizando a transformação maligna.

O TNF, analisado em nosso estudo, não mostrou significância estatística nem na amostra geral quanto no grupo Boa e Má resposta. Isso pode ser evidenciado em outro estudo (Pardo Govea et. al., 2005) que não encontrou diferença estatística e portanto, esta citocina não modifica sua expressão de acordo com a gravidade.

O papel crítico do TNF em doenças inflamatórias crônicas já está bem estabelecida tais como o seus efeitos de promoção de tumores (LIN, W.J., AND YEH, 2005). TNF produzido por células de tumor ou células inflamatórias no microambiente tumoral pode promover a sobrevivência de células tumorais através da indução de genes que codificam para NF-KB-dependentes de moléculas anti-apoptóticas. Outras ações do TNF que favorecem a progressão do tumor, em oposição a iniciação do tumor, incluem a promoção da angiogênese e metástase, assim como também a diminuição da capacidade de vigilância imunológica por fortalecer as reações imunossupressoras nas respostas de células T e na atividade citotóxica dos macrófagos ativados (MOCELLIN, S., ROSSI, C.R., PILATI, P., AND NITTI, 2005).

Duarte et. al., (2005) em um estudo com 195 pacientes com lesão de alto grau e 244 controles saudáveis relataram uma expressão aumentada do TNF em 2,5x no grupo com lesão de alto grau. O mesmo é descrito por (Kirckpatrick et al. 2004) que também observaram menor expressão dessa citocina no grupo de pacientes com NIC do que no grupo controle.

Por outro lado, diversas evidências sugerem que o TNF está direta e indiretamente envolvido em mecanismos efetores mediados pelas células imunes para o combate da infecção pelo HPV. Hagari et.al., (1995), presenciou altos níveis de expressão dessa citocina, correlacionando com os mecanismos de eliminação viral, como a apoptose e a regressão espontânea de lesões associadas ao HPV.

É sabido que TGF tem uma ação supressora sobre macrófagos contrapondo os efeitos do IFN na ativação da atividade citotóxica e dessa forma poderia contribuir para a perpetuação da infecção pelo HPV (BERMUDEZ, 1993). Em nosso estudo, o TGF, Amostra geral, sem significância estatística $p= 0,1143$, porém, quando se avalia a 1ª com a 2ª amostra, significância estatística $*p=0,0400$. No gráfico de média e tendência do TGF na Má Resposta, verifica-se aumento da concentração da 1ª (953,407), 2ª (1.003,77 pg/ml) até 3ª (1655,04pg/ml) amostra, sem significância estatística, $p=0,2054$. Postula-se que a indução precoce do TGF seria essencial para estabelecer o curso da infecção na ausência de IFN, determinando assim a proliferação do HPV dentro do macrófago e esta proliferação descontrolada, promoveria o desenvolvimento do padrão Th2 que é visto em algumas pacientes com lesão de alto grau e neoplasia invasiva, com inibição da resposta Th1 (Duarte et. al.,2005).

O aumento do conhecimento da importância da imunidade celular na resolução da infecção pelo HPV tem levado à realização de estudos terapêuticos com Interferons e em pacientes portadores de lesões de alto grau NIC II/III. Comparações entre pacientes que respondem e que não respondem ao tratamento com Interferon têm contribuído para o conhecimento da resposta efetiva contra o HPV (Tyring, S. K., et. al., 1998).

Diante dos nossos resultados, podemos afirmar que a imunoterapia com IFN 2b Peguilado altera o padrão e o comportamento sistêmico das citocinas produzidas pelos linfócitos T auxiliares (MICHELIN et al., 2015a). Estes dados estão de acordo com a sugestão de (SCOTT M, STITES DP, 1999) a qual postula que a persistência viral de infecção pelo HPV poderia ocorrer por falhas na expressão de citocinas perfil Th1.

Concluimos ainda que cada paciente apresenta um perfil imunológico específico e que a sua expressão é uma resultante de variáveis imunológicas. A expressão e secreção de diferentes níveis e perfis de citocinas, parece ser de extrema importância na resposta imune contra a infecção pelo HPV e na oncogênese das lesões cervicais.

7. CONCLUSÕES

- 1 O tratamento das Lesões de Alto Grau NIC II/III com Interferon Alfa-2b Peguilado subcutâneo apresentou 47 % de “Boa Resposta”.
- 2 Houve aumento na concentração IFN observado tanto na “Amostra Gera” e quanto nas pacientes com Boa Resposta.
- 3 Houve aumento da concentração sérica da IL-10 nas pacientes da “Amostra Geral” durante o tratamento, o que corrobora com resposta Th2.
- 4 Observou-se aumento da concentração sérica de TGF nas pacientes com “Má Resposta” caminhando para a resposta Th2.
- 5 Houve aumento da concentração da IL-6 nas pacientes que tiveram uma “Má Resposta”.

8. BIBLIOGRAFIA

- ABBAS AK, L. A. Cellular and Molecular Immunology. . **6th ed. Saunders**, 2003.
- AG., O. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: A critical review. **Int J Gynecol Pathol**, p. 186–92, 1993.
- AL-SALEH W, GIANNINI SL, JACOBS N, MOUTSCHEW M, DOYEN J, BONIVER J, D. P. Correlation of the T-Helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesion of the uterine cervix. **J Pathol**, v. 184, p. 283–290, 1998.
- BAIS AG, BECKMANN I, EWING PC, EIJKEMANS MJC, MEIJER CJLM, SNIJDERS PJF, ET AL. Cytokine release in HR-HPV(+) women without and with cervical dysplasia (CIN II and III) or carcinoma, compared with HR-HPV(-) controls. **Mediators Inflamm**, p. 2007:24147, 2007.
- BASKARAN, K. et al. Detection of High-Risk Human Papillomaviruses in the Prevention of Cervical Cancer in India. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 16, n. 18, p. 8187–90, 2015.
- BERMUDEZ, L. E. Production of transforming growth factor- β by Mycobacterium avium- infected human macrophages is associated with unresponsiveness to INF- γ . **Jour. Immunol.**, v. v. 150, p. p.1838-1845, 1993.
- BOST KL, BIELIGK SC, J. B. Lymphokine mRNA expression by transplantable murine B lymphocytic malignancies. Tumor-derived IL- 10 as a possible mechanism for modulating the anti-tumor response. **J Immunol**, p. 154:718-29., 1995.
- BOUVARD, V. ET AL. A review of human carcinogens. Part B: biological agents. **Lancet Oncology**, p. v. 10, n. 4, páginas 321–322, 2009.
- CANCER., I. A. FOR R. ON. Handbooks of Cancer Prevention: Cervix Cancer Screening. **Lyon: IARC**, 2005.
- CASTRO-VÁSQUEZ, M. C.; ARELLANO-GÁLVEZ, M. C. Acceso a La información de mujeres con VPH, displasia y cáncer cervical in situ. **Salud Pública de México, Cuernavaca**, p. v. 52, 207-212, 2010.
- CHAWLA-SARKAR, M.; LEAMAN, D.W.; BORDEN, E. . Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)- β compared with IFN- α 2: Correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines. **Clin. Cancer Res.**, p. 7, 1821–1831, 2001.

CHOO, Y.C.; SETO, W.H.; HSU, C.; TANY, Y.H.; MA, H.K.; NIG, M. . Cervical intraepithelial neoplasia treated by perilesional injection of interferon. **Br. J. Obstet. Gynaecol**, p. 93, 372–379, 1986.

CLERICI, M. et al. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: Association with human papillomavirus infection. **J Natl Cancer Inst**, v. 89, n. 3, p. 245–250, 1997.

CLERICI M, LUCEY DR, BERZOFKY JA, P. LA; WYNN TA, BLATT SP, ET AL. Restoration of HIVspecific cell-mediated immune response by interleukin-12 in vitro. **Science**, p. 262: 1721-4., 1994.

DE JONG, A.; VAN POELGEEST, M. I.; VAN DER HULST, J. M.; DRIJFHOUT, J. W.; FLEUREN, G. J.; MELIEF, C. J.; KENTER, G.; OFFRINGA, R.; VAN DER BURG, S. H. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. **Cancer Research, Baltimore**, p. v. 64, 5449-5455, 2004.

DE JONG A, VAN POELGEEST MI, VAN DER HULST JM, D. J.; FLEUREN GJ, MELIEF CJ, ET AL. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. **Cancer Res**, p. 64(15): 5449–55, 2004.

DEL VECCHIO, M.; BAJETTA, E.; CANOVA, S.; LOTZE, M.; PARMIANI, A. G. . & ANICHINI, A. Interleukin-12: Biological Properties and Clinical Application. **Clin. Cancer Res.**, p. v.3, n°16, 4677 – 4685, 2007.

DUARTE, I.; SANTOS, A.; SOUSA, H.; CATARINO, R.; PINTO, D.; MATOS, A.; PEREIRA, D.; MOUTINHO, J.; CANEDO, P.; MACHADO, JC.; MEDEIROS, R. G. TNF- α polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. **Biochem. Biophys. Res .Commun., New York**, p. 558–592, 2005.

EL-SHERIF, A.M.; SETH, R.; TIGHE, P.J.; JENKINS, D. Quantitative analysis of IL-10 and IFN- γ mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. **J. Pathol.**, v. 195, p. 179–185., 2001.

FRAZER, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 1, p. 46–54, 2004.

GATELY MK, WARRIER RR, HONASOGE S, C.; DM, FAHERTY DA, CONNAUGHTON SE, ET AL. Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of IFN-gamma in vivo. **Int Immunol**, p. 6:157-67, 1994.

H. VERBESSENUNG, H. Vulva, Vagine and Portio. In: **Inspektronsuroglich Keit Von Vulva, Vagine and Portio**. [s.l.: s.n.]. p. 77:1733.

HILDESHEIM A, SCHIFFMAN M, BROMLEY C, WACHOLDER S, HERRERO R, RODRIGUEZ AC, ET AL. Human Papillomavirus Type 16 Variants and Risk of Cervical Cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 91, p. 315–8, 2001.

HOULIHAN, C. F. et al. Human papillomavirus infection and increased risk of HIV acquisition. A systematic review and meta-analysis. **Aids**, v. 26, n. 17, p. 2211–2222, 2012.

IDOWU, A. et al. Determinants of Cervical Cancer Screening Uptake among Women in Ilorin, North Central Nigeria: A Community-Based Study. **Journal of Cancer Epidemiology**, v. 2016, n. Vili, p. 1–8, 2016.

INCA. **Cervical Intraepithelial Neoplasia -CIN**.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**.

JOHN DOORBAR. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, p. 110 (5) 525-54, [s.d.].

KEMP TJ, HILDESHEIM A, GARCIA-PIÑERES A, WILLIAMS MC, SHEARER GM, RODRIGUEZ AC, ET AL. Elevated systemic levels of inflammatory cytokines in older women with persistent cervical human papillomavirus infection. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, p. 1954–9., 2010.

KHAN, M. A. et al. Inhibition of growth, transformation, and expression of human papillomavirus type 16 E7 in human keratinocytes by alpha interferons. **J Virol**, v. 67, n. 6, p. 3396–3403, 1993.

KIM, R., EMI, M., TANABE, K., AND ARIHIRO, K. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. **Cancer Res.** **66**, p. 5527–5536, 2006.

KONYA J, D. J. Immunity to oncogenic human papillomaviruses. **Adv Cancer Res**, p. 82:205–38, 2001.

KUFE DW, POLLOCK RE, WEICHSELBAUM RR, BAST RCJR, GANSLER TS, HOLLAND JF, FREI III, E. Cancer Medicine. . **6th ed. Hamilton (Canada):**, p. BC Decker Inc, 2003.

L., W. H. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGFbeta-secreting regulatory cells. **Microbes Infect**, p. 11:947-54, 2001.

LEE BN, FOLLEN M, SHEN DH, MALPICA A, ADLER-STORTHZ K, SHEARER WT, ET AL. Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated CD4+ T

cells of women with human papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesion. **Clin Diagn Lab Immunol**, p. 11(2):239-44, 2004.

LESTERHUIS, W. J.; HAANEN, J. B. A G.; PUNT, C. J. A. Cancer immunotherapy--revisited. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 10, n. 8, p. 591–600, 2011.

LIMBERGER, A. et al. Aspectos imunológicos da infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV). **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 111–122, 2012.

LIN, W.J., AND YE, W. C. Implication of Toll- like receptor and tumor necrosis factor alpha signaling in septic shock. **Shock.**, p. 24:206–209, 2005.

LINDNER, D. Interferons as antiangiogenic agents. **Curr Oncol Rep**, p. 4(6):510-4, 2002.

LINSINGEN, R. V. Polimorfismos de genes de citocinas e do gene mica em pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical. **Universidade Federal do Paraná**, p. 126f, 2008.

LUCEY DR, CLERICI M, S. G. Type 1/type 2 cytokines in human infectious, neoplastic and inflammatory diseases. **Clin Microbiol Rev**, p. 9:532-62, 1996.

M, S. Immune responses to human papillomavirus. . **Vaccine**, p. Epub ahead of print., 2005.

MACHADO, F. A.; MICHELIN, M. A.; MURTA, E. F. C. The use of interferons in the treatment of pre-invasive cervical neoplasias. **Annual Review of Biomedical Sciences**, v. 13, p. 17–22, 2011.

MANTOVANI, A., SOZZANI, S., LOCATI, M., ALLAVENA, P., AND SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol.**, v. 23, p. 549–555, 2002.

MELLMAN, I.; COUKOS, G.; DRANOFF, G. Cancer immunotherapy comes of age. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 480–489, 2011.

MICHELIN, M. et al. Helper T Lymphocyte Response in the Peripheral Blood of Patients with Intraepithelial Neoplasia Submitted to Immunotherapy with Pegylated Interferon- α . **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5497–5509, 2015a.

MICHELIN, M. et al. Interleukin-12 in patients with cancer is synthesized by peripheral helper T γ δ lymphocytes. **Oncology Letters**, p. 1523–1526, 2015b.

MINDIOLA R, CAULEJAS D, NÚÑEZ-TROCONIS J, A. M.; DELGADO M, M. J. Increased number of IL- 2, IL-2 receptor and IL-10 positive cells in premalignant lesions of the cervix. **Invest Clin**, p. 533–45, 2007.

- MOCELLIN, S., ROSSI, C.R., PILATI, P., AND NITTI, D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. **Cytokine Growth Factor Rev**, p. 16:35–53, 2005.
- MONEY, D. M. et al. Canadian Consensus Guidelines on Human Papillomavirus Canadian Consensus Guidelines on. v. 29, n. 8, 2007.
- MORENO, V. et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: The IARC multicentric case-control study. **Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1085–1092, 2002.
- MOSCICKI, A. B. et al. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. **Vaccine**, v. 24, n. SUPPL. 3, p. 42–51, 2006.
- MOSCICKI, A. B. HPV infections in adolescents. **Dis. Markers**, p. 23, 229–234, 2007.
- MOSCICKI AB, HILLS N, SHIBOSKI S, POWELL K, JAY N, H. E.; AL., E. Risks for incident human papillomavirus infection and lowgrade squamous intraepithelial lesion development in young females. **JAMA**, p. 285(23):2995–3002, 2001.
- MUÑOZN, MÉNDEZ F, POSSOH, MOLANOM, VANDENBRULEAJC, RONDEROS M, ET AL. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. **J Infect Dis**, v. 190, p. 2077–87, 2004.
- MURTA, E.F.C.; TAVARES MURTA, B. . Successful pregnancy after vaginal cancer treated with interferon. **Tumori**, p. 90, 247–248, 2004.
- NAYAR, R.; WILBUR, D. C. The Pap test and Bethesda 2014. **Cancer Cytopathology**, p. n/a–n/a, 2015, 2015.
- NELSON, R. P.; BALLOU, M. Immunomodulation and immunotherapy: drugs, cytokines, cytokine receptors, and antibodies. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. v. 111, p. S720–S743, 2003.
- NGUYEN HH, BROKER TR, CHOW LT, ALVAREZ RD, VU HL, A. J.; AL, E. Immune responses to human papillomavirus in genital tract of women with cervical cancer. **Gynecology Oncol**, p. 96(2):452–61, 2005.
- NIEBLER, M. et al. Post-Translational Control of IL-1?? via the Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein: A Novel Mechanism of Innate Immune Escape Mediated by the E3-Ubiquitin Ligase E6-AP and p53. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 8, 2013.
- NIEDERKORN, J. Y. . Emerging cocepts in CD8+ T regulatory cells. **Current Opinion in Immunology, London**, p. v. 20, n. 3, páginas 327–331, 2008.
- NOMELINI, R.S.; MARDEGAN, M.C.; MURTA, E. F. C. Utilization of interferon in gynecologic and breast cancer. **Clin. Med. Oncol**, p. 1, 111–120, 2007.

- OH J-K, JU Y-H, FRANCESCHI S, QUINT W, S. H.-R. Acquisition of new infection and clearance of type-specific human papillomavirus infections in female students in Busan, South Korea: a follow-up study. **BMC Infectious Diseases**, p. 1–6, 2008.
- PAO, C.C.; LYN, C.Y.; YAO, D.S.; TSENG, C. . Differential expression of cytokines in cervical cancer tissues. *Biochem. Biochem Biophys Res Commun, New York*, v. 214, p. 1146–1151, 1995.
- PARDO-GOVEA, T.; CALLEJAS, D.; NÚÑEZ-TROCONIS, J.; ARAUJO, M.; COSTA, L.; PONS, H.; DELGADO, M.; MONSALVE, F. expression de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 em células de neoplasias intraepiteliais de cuello uterino: **Reporte preliminar. Invest. Clin., Maracaibo**, v. 46, p. p.5-13, 2005.
- PASSOS, M. R. L. ET AL. Papilomavírose humana em genital, parte I. **J. Bras Doenças sex Transm**, v. 20(2):, p. 108–124, 2008.
- PIQUÉ, X. C.; JOSÉ, F. X. Vacunas frente al virus del papiloma humano. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Barcelona**, p. v. 26, n. 1, páginas 65–77, 2008.
- PRENDIVILLE, W.; DAVIES, P. HPV handbook – 1: Human papillomavirus and cervical cancer. Abingdon. In: **Abingdon: Taylor & Francis**. [s.l: s.n.].
- RICHARDSNO, H.; FRANCO, E.; PINTOS, J.; BERGERON, J .; ARELLA, M.; TELLIER, P. Determinants of low-risk and high-risk cervical human papillomavirus infections in Montreal university students. **Sexually transmitted diseases, Estados Unidos**, v. 27, n. 2, p. 79–86, 2000.
- ROTELI-MARTINS, S. S. P. S. L; D. S.; M.; C. L.-F. A. T. S. B. M. E.; K., H. L. C. S. S. . Immunosuppressive cytokine interleukin-10 (IL-10) is up-regulated in high-grade CIN but not associated with high-risk human papillomavirus (HPV) at baseline, outcomes of HR-HPV infections or incident CIN in the LAMS cohort. **Virchows Arch.**, p. 455(6):505-15, 2009.
- SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P. E.; JERONIMO, J.; RODRIGUEZ, A. C.; WACHOLDER, S. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet, London**, p. v. 370, n. 9590, páginas 890–907, 2007.
- SCOTT M, STITES DP, M. A. Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection. **Clin Diagn Lab Immunol**, p. 6(5):751–5, 1999.
- SELLORS JW, KARWALAJTYS TL, KACZOROWSKI J, MAHONY JB, LYTWYN A, CHONG S, ET AL. Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. **JAMC**, v. 168, p. 168–74, 2007.

SHARMA A, RAJAPPA M, SAXENA A, S. M. Cytokine profile in Indian women with cervical intraepithelial neoplasia and cancer cervix. **Int J Gynecol Cancer.**, v. 17(4), p. 879–85, 2007.

SHULZHENKO, A. ET AL. Ménage à trois and evolutionary interplay between human papillomavirus, a tumor, and a woman. In: **Trends in Microbiology**. [s.l: s.n.]. p. v. 22, n. 6, páginas 345–353.

SMITH, J. S.; LINDSAY, L.; HOOTS, B.; KEYS, J.; FRANCESCHI, S.; WINER, R.; CLIFFORD, G. M. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. **International Journal of Cancer, New York**, v. v. 121, p. 621–632, 2007.

SMYTH, M.J., CRETNEY, E., KERSHAW, M.H., AND HAY- AKAWA, Y. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. **Immunol. Rev**, p. 275–293, 2004.

SNOECK, R; ANDREI, G; DE CLERRQ, E. Specific therapies for human papilloma virus infections. . **Curr Opin Infec Dis**, p. 11: 733-737, 1998.

SOLOMON, D. The 2001 Bethesda System:Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. **Jama**, v. 287, n. 16, p. 2114, 2002.

Stanley M. , [s.d.].

SUSANA AIDÉ, GUTEMBERG ALMEIDA, ISABEL DO VAL, NELSON VESPA JUNIOR, A. B. C. Neoplasia iNtraepitelial CerviCal. **DST - J bras Doenças Sex Transm**, p. 166–170, 2009.

TAVARES-MURTA, B. M. et al. Local profile of cytokines and nitric oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 138, n. 1, p. 93–99, 2008.

THYRELL L, ERICKSON S, ZHIVOTOVSKY B, POKROVSKAJA K, SANGFELT O, CASTRO J, EINHORN S, G. D. Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. **Oncogene 2002**, p. 21(8):1251-62, 2002.

TIRONE, N. R. et al. Local expression of interferon-alpha and interferon receptors in cervical intraepithelial neoplasia. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 58, n. 12, p. 2003–2010, 2009.

TYRING, S. K., ARANY, M. A.; STANLEY, M. A.; TOMAI, R. L.; MILLER, M. H.; SMITH, D. J.; MCDERMOTT, A. H. B. S. A randomized, controlled, molecular study of condylomata acuminata clearance during treatment with imiquimod. **J. Infect. Dis.**, v. v.178, p. 551–555, 1998.

WATANABE, Y. & JACOB, C. O. Regulation of MHC class II antigen expression.

Opposing effects of tumor necrosis factor- α on IFN- γ -induced HLA-DR and Ia expression depends on the maturation and differentiation stage of the cell. **Jour. Immunol., Bethesda**, v. v. 146, p. 899–905, 1991.

WHO. **Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer.**

WOODWORT CD, S. S. Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized, and carcinoma cell lines. **Am J Pathol**, p. 142:1544-55, 1993.

WRIGHT TC, MASSAD S, D. C. ET AL. Consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. **Am J of Obstet Gynecol**, v. 197, p. 346–55, 2007.

YAN J, CHEN SL, WANG HN, W. T. Meta-analysis of 5% imiquimod and 0.5% podophyllotoxin in the treatment of condylomataacuminata. **Dermatology.**, p. 213(3): 218-223, 2006.

ZHU, J. & PAUL, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **BLOOD**, v. 112, p. n°5, 1557-1569, 2008.

TERMO DE ESCLARECIMENTO

Você tem um tipo de doença denominada neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) de alto grau e está sendo convidada a participar do estudo “Uso do IFN peguilhado, resposta clínica e inflamatória, em pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau após tratamento com IFN α -2b”. Os avanços na área de saúde ocorrem através de estudos como este, por isso sua participação é importante. O objetivo do estudo é:

- Tratar a doença com uma medicação denominada IFN α -2b que será administrada no subcutâneo, ou seja, injeção “debaixo da pele” com auxílio de uma seringa e agulha.
- Será avaliada a resposta ao tratamento (por exemplo, se houve melhora ou não da lesão) e se analisará a importância do sistema de defesa durante o tratamento.

E caso você participe, será necessário coletar material para estudo que estamos propondo, além dos que já são normalmente coletados para os exames de rotina. É também importante que:

- A medicação será aplicada 1 vez por semana por 6 semanas (total de 06 aplicações);
- É de suma importância o comparecimento nos dias das aplicações para não prejudicar o tratamento;
- Você deverá usar método anticonceptivo durante o tratamento, pois a medicação pode acarretar vários danos para o bebê em caso de gestação no curso do tratamento.
- A medicação pode ocasionar alguns efeitos colaterais como: Febre, calafrios, mal-estar geral, mialgia, diminuição do apetite, diminuição dos leucócitos e plaquetas.
- No caso de não ocorrer melhora da doença ou mesmo se houver apenas melhora parcial você será prontamente encaminhada para tratamento cirúrgico complementar.

Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em

dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificada com um número.

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.

Uberaba, / /

Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

Documento de identidade

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador orientador

Telefone de contato dos pesquisadores: _____

Em caso de dúvida em relação a esse documento, você pode entrar em contato com o Comitê Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelo telefone 3318-5854.

ANEXO 3**PROTOCOLO INTERFERON****Critérios de Inclusão:**

1. Lesão de alto grau – NIC II e/ou III à CO confirmada por biópsia
 2. Não tabagista
 3. Menor 50 anos (não precisa se a JEC for visível)
 4. Lesão no colo uterino > 1 cm²
 5. JEC visível
- Registrar as fotos para avaliar a extensão da lesão. Deve-se tirar uma foto antes e outra após cada tratamento. Colocar um papel com 1 cm e depois fazer uma inferência.
 - A citologia e biópsia devem ser realizadas no início e final do tratamento, após 1 semana da última injeção com boa ou má resposta.
 - O soro e a secreção vaginal são coletados antes, na terceira aplicação, e uma semana após a última aplicação. Se não tiver lesão colposcópica, fazer a biópsia no mesmo ponto da biópsia anterior.
 - **Todas as pacientes deverão ter seus dados registrados no caderno já organizado e próprio para esse fim, com endereço e telefone para contato.**
 - **Todos os atendimentos e aplicações devem ser anotados no prontuário e na ficha de colposcopia.**

Em resumo:

Há uma citologia e biópsia inicial: Diagnóstica. Avaliação dos critérios de inclusão.

A paciente é encaminhada para mim. Neste momento será orientada.

Retornará em 1 semana. Neste momento: Assinará consentimento; documentar extensão da lesão e visualização da JEC; Coleta de secreção em fundo de saco vaginal; Coleta de citologia e biópsia (trizol e formol); coleta de soro.

Retornará em 1 semana: início das aplicações de interferon: 6 aplicações semanais.

- **1ª semana:** aplicação de IFN α -2b administrado no subcutâneo com auxílio de uma seringa e agulha; colhido 1ª amostra de sangue periférico, colposcopia e biópsia de colo do útero.

2ª semana: aplicação de IFN α -2b administrado no subcutâneo com auxílio de uma seringa e agulha

3ª semana: aplicação de IFN α -2b administrado no subcutâneo com auxílio de uma seringa e agulha; colhido 2ª amostra de sangue periférico

4ª semana: aplicação de IFN α -2b administrado no subcutâneo com auxílio de uma seringa e agulha;

5ª semana: aplicação de IFN α -2b administrado no subcutâneo com auxílio de uma seringa e agulha;

6ª semana: aplicação de IFN α -2b administrado no subcutâneo com auxílio de uma seringa e agulha; colhido 3ª amostra de sangue periférico, colposcopia e biópsia de colo do útero.

- **Registrar as fotos para avaliar a extensão da lesão.**

ANEXO 4: Concentrações de cada citocina, por paciente, em amostras colhidas durante o tratamento com IFN 2b Peguilado.

Paciente	Citocina	Concentração em pg/ml		
		1 Amostra	2 Amostra	3 Amostra
1	IL-10	0	0	0
2	IL-10	0	0	0
3	IL-10	0	0	0
4	IL-10	0	0	0
5	IL-10	0	0	0
6	IL-10	0	2829,749	0
7	IL-10	0	0	0
8	IL-10	0	0	0
9	IL-10	0	2089,115	1546,834
10	IL-10	0	1931,785	16325,04
11	IL-10	0	0	0
12	IL-10	0	38,478	0
13	IL-10	0	7947,499	1796,047
14	IL-10	0	0	0
15	IL-10	0	0	0
16	IL-10	0	4485,359	2762,931
17	IL-10	0	0	0
1	IL-4	21,018	136,802	13,938
2	IL-4	11,725	45,642	48,588
3	IL-4	31,838	87,201	20,476
4	IL-4	22,534	10,61	154,622
5	IL-4	14,24	123,013	34,876
6	IL-4	45,479	51,216	55,134
7	IL-4	380,03	23,704	58,282
8	IL-4	24,134	25,663	56,748
9	IL-4	55,258	13,863	62,275
10	IL-4	26,804	37,046	37,046
11	IL-4	103,9568	41,9176	56,4164
12	IL-4	84,816	71,993	109,413
13	IL-4	135,23	132,633	181,161
14	IL-4	70,983	75,196	99,87
15	IL-4	103,926	68,799	44,867
16	IL-4	48,875	45,234	56,417
17	IL-4	138,647	56,707	103,883
1	IL-8	20,699	19	23,52
2	IL-8	34,606	28,096	99,028
3	IL-8	163,775	9,034	14,955

4	IL-8	271,944	8,344	12,858
5	IL-8	142,51	42,337	19,553
6	IL-8	8,441	14,256	1,717
7	IL-8	30,357	24,395	41,07
8	IL-8	13,728	43,083	11,232
9	IL-8	0	24,039	135,362
10	IL-8	40,581	0	29,237
11	IL-8	13,5416	26,7134	44,4988
12	IL-8	16,476	26,246	10,607
13	IL-8	19,051	40,917	51,487
14	IL-8	2,595	47,001	91,466
15	IL-8	20,385	5,837	36,957
16	IL-8	33,113	76,303	15,753
17	IL-8	155,561	241,99	308,364
1	IL-2	69,616	21,087	17,222
2	IL-2	16,944	4,517	25,607
3	IL-2	7,846	10,722	0
4	IL-2	8,31	3,981	11,666
5	IL-2	25,374	46,59	39,677
6	IL-2	192,411	0	0
7	IL-2	18,806	9,064	5,003
8	IL-2	4,827	7,549	15,267
9	IL-2	4,383	0	18,055
10	IL-2	34,032	346,968	64,675
11	IL-2	52,43129	56,701	14,71429
12	IL-2	0	2,979	10,475
13	IL-2	26,304	36,095	45,224
14	IL-2	21,205	4,07	10,887
15	IL-2	15,507	15,307	23,509
16	IL-2	16,306	9,439	11,544
17	IL-2	15,067	7,803	14,906
1	IL-1B	0	0	0
2	IL-1B	0	0	2,966
3	IL-1B	0	48,204	35,882
4	IL-1B	6,95	62,256	85,496
5	IL-1B	3,097	0	0
6	IL-1B	65,167	0,155	0
7	IL-1B	0	0	0
8	IL-1B	0	7,111	0
9	IL-1B	0	0	0
10	IL-1B	0	255,175	29,157
11	IL-1B	0	0	0
12	IL-1B	0	0	0
13	IL-1B	0	0	0
14	IL-1B	175,068	0	0

15	IL-1B	0	0	0
16	IL-1B	0	0	87,06
17	IL-1B	0	29,157	0
1	IL-6	0	0	37,802
2	IL-6	0	33,378	10,988
3	IL-6	21,187	85,167	40,084
4	IL-6	9,452	36,442	88,457
5	IL-6	35,73	333,901	343,805
6	IL-6	40,309	72,814	98,292
7	IL-6	1,231	33,163	223,481
8	IL-6	50,974	46,556	46,055
9	IL-6	77,186	23,864	122,997
10	IL-6	39,898	75,58	67,035
11	IL-6	42,99871	69,91029	186,16884
12	IL-6	47,735	54,637	34,912
13	IL-6	22,517	19,682	19,282
14	IL-6	22,914	34,315	45,959
15	IL-6	18,439	17,541	57,726
16	IL-6	20,683	21,629	20,521
17	IL-6	62,18	30,99	220,117
1	IFN	38,76	0	38,358
2	IFN	2,535	4,276	35,308
3	IFN	0	18,503	189,185
4	IFN	12,842	0	78,68
5	IFN	2,239	0	54,575
6	IFN	7,4315	19,55429	58,59613
7	IFN	66,197	233,845	538,503
8	IFN	0	25,129	150,481
9	IFN	91,287	82,534	32,428
10	IFN	168,075	27,988	86,726
11	IFN	48,669	72,999	398,974
12	IFN	86,94114	90,34872	194,0019
13	IFN	144,952	0	19,489
14	IFN	0	320,434	67,255
15	IFN	15,545	21,341	314,668
16	IFN	16,183	0	53,429
17	IFN	381,18	119,061	223,176
1	TNF	6,75	6,975	13,025
2	TNF	11,35	130,913	9,701
3	TNF	8,385	10,967	29,815
4	TNF	7,909	6,84	12,859
5	TNF	13,14	6,207	7,875
6	TNF	9,222	20,392	5,425
7	TNF	6,207	9,809	5,543
8	TNF	10,635	12,163	8,819

9	TNF	6,141	7,28	5,436
10	TNF	15,907	7,794	10,16
11	TNF	13,076	11,387	22,763
12	TNF	21,677	46,005	16,267
13	TNF	10,208	15,92	71,528
14	TNF	9,485	25,39	8,245
15	TNF	7,45	31,503	7,932
16	TNF	18,655	14,054	11,487
17	TNF	13,795	8,973	8,455
1	TGF	3242,763	1877,629	2908,128
2	TGF	2237,389	390,943	2180,000
3	TGF	0	0	0
4	TGF	0	504,038	909,980
5	TGF	0	366,335	801,090
6	TGF	0	595,504	1880,884
7	TGF	1520,353	1140,183	1236,307
8	TGF	0	838,305	3034,247
9	TGF	2645,953	1706,625	1647,076
10	TGF	0	690,591	0
11	TGF	0	2210,513	1871,340
12	TGF	0	93,104	1763,980
13	TGF	0	1127,749	0
14	TGF	0	531,512	0
15	TGF	0	0	0
16	TGF	0	3468,465	0
17	TGF	2176,965	2026,68	2566.670
1	IL-12	235,432	196,03	324,476
2	IL-12	386,64	106,933	0
3	IL-12	313,846	183,992	0
4	IL-12	140,622	141,036	531,601
5	IL-12	222,0358	128,0888	219,0537
6	IL-12	84,283	244,344	0
7	IL-12	334,704	251,726	165,02
8	IL-12	113,065	32,832	197,958
9	IL-12	313,136	154,957	284,145
10	IL-12	80,528	90,3	0
11	IL-12	145,161	304,947	0
12	IL-12	290,985	0	0
13	IL-12	136,051	212,87	600,496
14	IL-12	209,447	187,892	0
15	IL-12	1795,128	244,344	0
16	IL-12	442,8833	169,4747	100,0827