

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

LETÍCIA MONTES STARK

**AVALIAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DO INTERFERON-ALPHA E DO  
PERFIL DE LINFÓCITOS T EM PACIENTES COM NEOPLASIA  
INTRAEPITELIAL CERVICAL TRATADAS COM INTERFERON- $\alpha$  2b  
PEGUILADO**

UBERABA – MG

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

LETÍCIA MONTES STARK

**AVALIAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DO INTERFERON-ALPHA E DO  
PERFIL DE LINFÓCITOS T EM PACIENTES COM NEOPLASIA  
INTRAEPITELIAL CERVICAL TRATADAS COM INTERFERON- $\alpha$  2b  
PEGUILADO**

Tese apresentada ao Curso 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 Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin

Uberaba – MG

2017

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

S796a Stark, Leticia Montes  
Avaliação das vias de sinalização do Interferon-alpha e do perfil de linfócitos T em pacientes com neoplasia intraepitelial cervical tratadas com Interferon- $\alpha$  2b Peguilado / Leticia Montes Stark. -- 2017.  
90 f. : il., fig., graf., tab.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017

Orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta  
Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazzi Michelin

1. Neoplasia intraepitelial cervical. 2. Imunoterapia. 3. Interferon-alfa. I. Murta, Eddie Fernando Candido. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 618.146-006

**LETÍCIA MONTES STARK**

***AVALIAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DO INTERFERON-ALPHA E DO PERFIL DE LINFÓCITOS T EM PACIENTES COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL TRATADAS COM INTERFERON- $\alpha$  2b PEGUILADO***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Humana, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do Título de Doutor.

Uberaba, 08 de agosto de 2017.

*Banca Examinadora*

---

Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta – Orientador  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi  
Universidade Federal de Uberlândia

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Millena Prata Jammal  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Prof. Dr. Paulo César Fernandes Júnior  
Universidade Federal de Uberlândia

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Margarida Etchebehere  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

## DEDICATÓRIA

*A Jesus, Deus que humildemente se fez homem e habitou entre nós, fortaleza e rochedo, presença viva a acalantar meus anseios e vivificar meus sonhos. A ti quero dedicar toda a minha vida.*

*Ao meu pai Davidson, exemplo de pai, mestre e amigo. Com carinho, simplicidade, amor e sabedoria ensinaste-me a dar os primeiros passos e, se hoje posso alçar voos mais altos, é porque tenho o teu apoio.*

*À minha mãe Nilma, pelo amor incondicional e dedicação carinhosa. Desde muito cedo me ensinaste o gosto pelos estudos e pela leitura. Sempre zelosa e companheira, minha melhor amiga!*

*Ao meu esposo Gustavo, pela alegria dos dias compartilhados, aprendizado constante, doação amorosa que me eleva a ser mais de Deus. Eu te amo!*

*À Vilma, querida tia e madrinha, pela presença constante durante todos os meus passos na vida!*

*À Vania e Gustavo, minha eterna gratidão pelo apoio em todos os momentos!*

*Aos meus irmãos Lívia e Lucas, pelo incentivo em todas as horas e pelo carinho.*

*Às pequenas Maria Fernanda e Maria Cecília, que trouxeram para minha vida o brilho radiante da infância e a graça de ser madrinha e tia.*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Doutor Eddie Fernando Candido Murta, pela orientação e por ensinar-me com seu exemplo de professor pesquisador que a dedicação e a ética são caminhos seguros para o desenvolvimento científico.

À professora Doutora Márcia Antoniazi Michelin, pelo aprendizado para a docência e para a vida. Cuidas com carinho e responsabilidade de cada um de teus alunos. Minha gratidão pela confiança e por mostrar-me que posso ser melhor a cada dia.

À professora Doutora Rosekeila Simões Nomelini e ao Doutor Marco Aurélio Trovó, pelos ensinamentos em colposcopia. A dedicação com que cuidam dos pacientes é admirável.

À professora Edna Valim, por ensinar-me o caminho para a docência com zelo e amizade.

Aos amigos do IPON André, Ângela, Cláudia, Eduardo, Saulo, Rodrigo, Isadora, Laís, Lázaro, Alessandra, Jéssica, Chamberttan, Tauana, Poliana, Milena e Luciana pela convivência harmoniosa e parceria científica.

Às amigas da Citologia Zelma, Dóris, Nair, Nilva e Daniela pela disponibilidade em auxiliar-me sempre que precisei e pela convivência leve e alegre.

Aos colaboradores das disciplinas de Imunologia; Ginecologia e Obstetrícia: Andréia e Fabiano; Fátima, Andréia, Simone e Ângela, pelo auxílio e apoio.

Aos técnicos Luan, Cláudio e Andjara, pelo aprendizado técnico e pela amizade.

Às pacientes, que gentilmente aceitaram participar da pesquisa.

Aos alunos da graduação, pelo aprendizado à docência.

Às agências de fomento à pesquisa FAPEMIG e CAPES.

*“Se temos de esperar, que seja para colher a semente boa que lançamos hoje no solo da vida.  
Se for para semear, então que seja para produzir milhões de sorrisos, de solidariedade e  
amizade.”*

***Cora Coralina***

*“A pesquisa científica deve tutelar a vida e a dignidade das pessoas!”*

***Papa Francisco***

*“Paraíso... Paraíso... eu prefiro o Paraíso!”*

***São Felipe Néri***

## RESUMO

Os Interferons são glicoproteínas secretoras induzíveis que têm efeitos imunomoduladores, antivirais, antiangiogênicos e antiproliferativos. Seu efeito antitumoral tem sido pesquisado em diferentes graus patológicos, sendo observado o desenvolvimento de mecanismos de escape da resposta imune, como a inibição de genes Interferon-estimulados. Esta pesquisa procura, portanto, elucidar a responsividade sistêmica à Alfapeguinterferona-2b em pacientes com Neoplasia Intraepitelial Cervical graus II e III e o perfil funcional de linfócitos T após o tratamento, a fim de melhor conhecer os mecanismos imunológicos envolvidos na regressão da lesão após imunoterapia. **Objetivo:** Este estudo tem como meta avaliar, sistemicamente e localmente, os receptores de Interferon- $\alpha$  e os fatores de transcrição T-bet, ROR $\gamma$ T, STAT1 e IRF7 (envolvidos na ativação celular pela ligação do IFN- $\alpha$  ao seu receptor), bem como a produção endógena de IFN- $\alpha$  por linfócitos TCD3+, CD4+ ou CD8+, monócitos CD14+ no sangue periférico de pacientes com Neoplasia Intraepitelial Cervical tratadas com Alfapeguinterferona-2b. **Método:** Desenvolveu-se um estudo prospectivo, onde dezoito pacientes diagnosticadas com NIC II e NIC III foram incluídas no protocolo de tratamento com Alfapeguinterferona (injeções subcutâneas com 80  $\mu$ g / 0,5 mL por semana, durante seis semanas). As células foram avaliadas por citometria de fluxo e PCR em tempo real e os dados analisados por teste de Kruskal-Wallis, Wilcoxon e ANOVA, sendo considerados  $p \leq 0,05$ . **Resultados:** Oito pacientes que não obtiveram boa resposta ao tratamento apresentaram um aumento de linfócitos T CD4+ com IFNR1 e IFNR2 ( $p = 0,0336$ ;  $p = 0,0165$ ) quando comparadas às que responderam. Ao analisar linfócitos TCD8+, quando comparadas as etapas do tratamento com a regressão da lesão observou-se significativa redução de IFNR1 ( $p=0,0391$ ) e IRF7 ( $p=0,05$ ) em pacientes que não obtiveram a regressão da lesão quando comparada a 3ª aplicação com a 6ª. Nas pacientes que obtiveram regressão da lesão houve uma queda da intensidade de fluorescência de IFN- $\alpha$  na 6ª aplicação ( $p=0,05$ ). Observou-se o aumento na expressão local de ROR $\gamma$ T em pacientes que não responderam ao tratamento, quando comparadas às que responderam ( $p = 0,01$ ). **Conclusão:** A análise dos resultados mostra que no tratamento com Alfapeguinterferona há um aumento significativo da expressão local de ROR $\gamma$ T em pacientes que não obtiveram regressão da lesão. Estas pacientes também apresentaram aumento de linfócitos TCD4+ marcados com IFNR1 e IFNR2. Estes dados sugerem que podem existir mecanismos de escape tumoral que impedem a eliminação da lesão pela imunomodulação por Alfapeguinterferona.

**Palavras-chave:** Imunoterapias, Interferon- $\alpha$ , Neoplasia Intraepitelial Cervical.



## ABSTRACT

Interferons are inducible secretory glycoproteins with immunomodulators, antiviral, antiangiogenic and antiproliferative effects. Its antitumor effect has been researched under several pathological conditions, and it has been observed the development of escape mechanisms by the antitumor immune response, such as the downregulation of Interferon-stimulated genes. The following research seeks to clarify the systemic responsiveness to Peginterferon Alfa-2B in patients diagnosed with Cervical Intraepithelial Neoplasia grades II and III, as well as the T lymphocytes cervical profile after treatment, in the interest of understanding the immunological mechanisms involved in lesion regression after immunotherapy. **Objective:** This study aims to evaluate, systemically and locally, Interferon- $\alpha$  receptors and transcription factors of T-bet, ROR $\gamma$ T, STAT1 e IRF7, as well as the endogenous produced IFN- $\alpha$  by CD3+, CD4+, CD8+ T lymphocytes and monocytes (CD14+) in the peripheral blood of patients diagnosed with Cervical Intraepithelial Neoplasia, during treatment with Peginterferon Alfa-2B. **Methods:** A prospective study was developed in which eighteen patients diagnosed with CIN II and CIN III were included in treatment protocol with Peginterferon Alfa (subcutaneous injections with 80  $\mu$ g / 0.5 mL per week, during six weeks). Cells were evaluated using Real-Time flow cytometry and the data was analyzed using Kruskal-Wallis, Wilcoxon and ANOVA tests, considering  $p \leq 0.05$ . **Results:** Eight patients obtained regression of the lesion and ten did not obtain the regression. Patients who did not respond positively to the treatment presented a CD4+ T lymphocyte with IFNR1 and IFNR2 ( $p = 0.0336$ ;  $p = 0.0165$ ) increase when compared to patients who responded positively. When analyzing CD8+ T lymphocytes during the stages of treatment in lesion regression, it is observed a significant IFNR1 ( $p=0.0391$ ) and IRF7 ( $p=0.05$ ) decrease in patients who did not achieve lesion regression when comparing the third and sixth applications. It was noticed an increase of ROR $\gamma$ T local expression in patients who did not responded positively to the treatment compared to those who responded positively ( $p = 0.01$ ). **Conclusion:** Analysis shows that treatment with Peginterferon Alfa significantly increased the ROR $\gamma$ T local expression in patients who did not achieve lesion regression. These patients also presented an increase of CD4+ T lymphocytes IFNR1 and IFNR2. This data suggests that there may exist tumor escape mechanisms that avoid lesion elimination by Peginterferon Alfa immunomodulation.

**Keywords:** Immunotherapy, Interferon- $\alpha$ , Cervical Intraepithelial Neoplasia

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1:** Processo de fosforilação do STAT1 e do STAT2.

**Figura 2:** Vias de sinalização dos IRFs.

**Figura 3:** Ativação de genes induzíveis por IFN $\alpha/\beta$ .

**Figura 4:** Fotos colposcópicas do colo uterino de paciente que apresentou regressão da lesão.

**Figura 5:** Representação da estratégia de análise por FACS e figura representativa do *layout* do *software* CellQuest (*BD Biosciences*).

**Figura 6:** Representação gráfica da curva de amplificação (A e C) e de dissociação (B e D) de ROR $\gamma$ t através do *software* SDS Real Time.

**Figura 7:** Representação gráfica da curva de amplificação (A e C) e de dissociação (B e D) de Tbet através do *software* SDS Real Time.

**Figura 8:** Representação gráfica da curva de amplificação (A e C) e de dissociação (B e D) de IFNR1 através do *software* SDS Real Time.

**Figura 9:** Representação gráfica da curva de amplificação (A e C) e de dissociação (B e D) de IFNR2 através do *software* SDS Real Time.

**Figura 10:** Representação gráfica da curva de amplificação (A e C) e de dissociação (B e D) IFN- $\alpha$  através do *software* SDS Real Time.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Aplicabilidade da Imunoterapia com Interferon- $\alpha$ .

**Tabela 2:** Características clínicas, diagnóstico antes e após a imunoterapia com IFN- $\alpha$  2b peguilado.

**Tabela 3:** Marcações extracelulares e intracelulares para citometria de fluxo.

**Tabela 4:** Protocolo utilizado para a primeira etapa da reação de RT.

**Tabela 5:** Protocolo utilizado para a segunda etapa da reação de RT.

**Tabela 6:** Protocolo utilizado para a reação de qPCR.

**Tabela 7:** Protocolo de temperaturas para a reação de qPCR.

**Tabela 8:** Desenho dos *primers*, temperaturas de anelamento e volumes.

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1:** **A** - Valores da porcentagem de *gate* dos linfócitos T (CD3+) positivos para IFNR1. **B** - Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do IFNR1 em linfócitos T totais.

**Gráfico 2:** **A** - Valores da porcentagem de *gate* dos linfócitos T (CD3+) positivos para IFNR2. **B** - Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do IFNR2 em linfócitos T totais.

**Gráfico 3:** **A** - Valores da porcentagem de *gate* dos linfócitos T (CD3+) positivos para STAT-1. **B** - Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do STAT-1 em linfócitos T totais.

**Gráfico 4:** **A** - Valores da porcentagem de *gate* dos linfócitos T (CD3+) positivos para IRF-7. **B** - Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do IRF-7 em linfócitos T totais.

**Gráfico 5:** **A** - Valores da porcentagem de *gate* dos linfócitos T (CD3+) positivos para IFN- $\alpha$ . **B** - Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do IFN- $\alpha$  em linfócitos T totais.

**Gráfico 6:** **A/C** - Valores da porcentagem de *gate* dos linfócitos T auxiliares positivos para IFNR1 e IFNR2, respectivamente. **B/D** - Valores da intensidade de fluorescência (MIF) de IFNR1 e IFNR2, respectivamente, em linfócitos T auxiliares.

**Gráfico 7:** **A/C/E** - Valores da porcentagem de *gate* dos linfócitos T auxiliares positivos para STAT1, IRF7 e IFN- $\alpha$ , respectivamente. **B/C/F** - Valores da intensidade de fluorescência (MIF) de STAT1, IRF7 e IFN- $\alpha$ , respectivamente, em linfócitos T auxiliares.

**Gráfico 8:** Valores da porcentagem de *gate* dos linfócitos T auxiliares positivos para **A** - IFNR1, **B** - IFNR2, **C** - STAT1, **D** - IRF7, **E** - IFN- $\alpha$ .

**Gráfico 9:** **A/C** - Valores da porcentagem de *gate* dos linfócitos T citotóxicos positivos para IFNR1, IFNR2, respectivamente. **B/D** - Valores da intensidade de fluorescência (MIF) de IFNR1 e IFNR2, respectivamente, em linfócitos T citotóxicos.

**Gráfico 10:** **A/C/E** - Valores da porcentagem de *gate* dos linfócitos T citotóxicos positivos para STAT1, IRF7 e IFN- $\alpha$ , respectivamente. **B/D/F** - Valores da intensidade de fluorescência (MIF) de STAT1, IRF7 e IFN- $\alpha$ , respectivamente, em linfócitos T citotóxicos.

**Gráfico 11:** Valores da intensidade de fluorescência (MIF) dos linfócitos T citotóxicos positivos para **A** - IFNR1, **B** - IFNR2, **C** - STAT1, **D** - IRF7, **E** - IFN- $\alpha$ .

**Gráfico 12:** **A** - Valores da porcentagem de *gate* dos monócitos positivos para IFNR1. **B** - Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do IFNR1 em monócitos.

**Gráfico 13:** **A** - Valores da porcentagem de *gate* dos monócitos positivos para IFNR2. **B** - Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do IFNR2 em monócitos.

**Gráfico 14:** **A** - Valores da porcentagem de *gate* dos monócitos positivos para STAT1. **B** - Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do STAT1 em monócitos.

**Gráfico 15:** **A** - Valores da porcentagem de *gate* dos monócitos positivos para IRF7. **B** - Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do IRF7 em monócitos.

**Gráfico 16:** **A** - Valores da porcentagem de *gate* dos monócitos positivos para IFN- $\alpha$ . **B** - Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do IFN- $\alpha$  em monócitos.

**Gráfico 17:** Valores da normalização matemática do  $\Delta\Delta Ct$ , que representa o número de vezes que o gene ROR $\gamma t$  foi expresso.

**Gráfico 18:** Valores da normalização matemática do  $\Delta\Delta Ct$ , que representa o número de vezes que o gene T-bet foi expresso.

**Gráfico 19:** Valores da normalização matemática do  $\Delta\Delta Ct$ , que representa o número de vezes que o gene IFNR1 foi expresso.

**Gráfico 20:** Valores da normalização matemática do  $\Delta\Delta Ct$ , que representa o número de vezes que o gene IFNR2 foi expresso.

**Gráfico 21:** Valores da normalização matemática do  $\Delta\Delta Ct$ , que representa o número de vezes que o gene IFN-alpha foi expresso.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ASC-H	<i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance Cannot Exclude HSIL</i>
ASC-US	<i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i>
CAF	Cirurgia de Alta Frequência
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
HPV	Papilomavírus Humano
HSIL	<i>High-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFIT-1	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>
IFN	Interferon
IFNR	Receptor de Interferon
IKK $\epsilon$	<i>Inducible <math>\epsilon</math>B-kinase</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
ISG	<i>Interferon Stimulated Gene</i>
ISGF	<i>Interferon-Stimulated Gene Factor</i>
ISRE	<i>Interferon-Stimulated Response Element</i>
JAK	Janus kinase
LSIL	<i>Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>
MDA-5	<i>Melanoma Differentiation Associated Gene-5</i>
MMP9	Metaloproteinase de Matriz 9
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical

NK	<i>Natural Killer Cell</i>
RIG-1	<i>Retinoic Acid-Inducible Gene 1</i>
RRP	Receptores de Reconhecimento de Padrão
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TBK-1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TLR	Receptor Toll-like
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRAIL	<i>Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand</i>
TYK	<i>Tyrosine kinase</i>
XAF-1	<i>X-linked inhibitor of Apoptosis Factor-1</i>

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	VI
<b>ABSTRACT</b> .....	VII
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	VIII
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	X
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	XII
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 Neoplasia Intraepitelial Cervical: epidemiologia, imunopatologia e tratamento ..	16
1.2 Atividade antitumoral dos Interferons e suas implicações na terapia clínica .....	18
1.3 Propriedades químicas e características biológicas do PEG Intron .....	25
1.4 Receptores de Interferon- $\alpha$ e suas vias de ativação .....	26
1.5 Plasticidade na diferenciação dos linfócitos TCD4+ .....	30
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	32
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	34
3.1 Objetivos Gerais .....	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
<b>4 CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	35
4.1 Delineamento do estudo .....	35
4.2 Casuística.....	35
4.2.1 Aspectos Éticos.....	35
4.2.2 Critérios de Inclusão .....	35
4.2.3 Critérios de Exclusão .....	36
4.2.4 Aplicação do Interferon- $\alpha$ Peguilado.....	36
4.2.5 Avaliação da resposta clínica ao tratamento .....	36
4.3 Análise Celular por Citometria de Fluxo .....	37
4.4 Análise por qPCR (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction).....	39
4.4.1 Extração do RNA .....	39
4.4.2 Transcrição Reversa.....	39
4.4.3 Reação de PCR em tempo real .....	40
4.4.4 Cálculo do $\Delta\Delta C_t$ .....	42
4.5 Análise estatística dos resultados .....	42



<b>5 RESULTADOS</b> .....	43
5.1 <b>Análise dos linfócitos T Totais</b> .....	46
5.2 <b>Análise dos linfócitos T Auxiliares</b> .....	50
5.3 <b>Análise dos linfócitos T Citotóxicos</b> .....	53
5.4 <b>Análise dos monócitos</b> .....	56
5.5 <b>Análise do gene ROR<math>\gamma</math>t</b> .....	59
5.6 <b>Análise do gene T-bet</b> .....	61
5.7 <b>Análise do gene IFNR1</b> .....	63
5.8 <b>Análise do gene IFNR2</b> .....	65
5.9 <b>Análise do gene IFN-<math>\alpha</math></b> .....	67
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	69
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	76
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77
<b>ANEXOS</b> .....	86

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Neoplasia Intraepitelial Cervical: epidemiologia, imunopatologia e tratamento

Estudos realizados ao longo das últimas três décadas têm relacionado a origem do câncer cervical a lesões causadas pela infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) (BOULET et al., 2007). Atualmente, com o advento da biologia molecular, o DNA deste vírus é encontrado em 90% das biópsias realizadas (TINDLE, 2002). O diagnóstico é mais comum em adolescentes e em mulheres com faixa etária compreendida entre 45 a 50 anos. Lesões intraepiteliais consideradas de baixo grau regredem em até 80% dos casos em mulheres adultas, chegando a 90% em adolescentes (SCHWARZ et al., 2009).

A infecção por HPV é a principal causa de câncer cervical e, também, um fator relevante para o desenvolvimento de outros tumores anogenitais (ânus, vulva, vagina e pênis), bem como de cabeça e pescoço. Os tipos 16 e 18 do HPV são responsáveis por cerca de 70% de todos os casos de câncer no mundo. Ademais, existem atualmente 2.716 milhões de mulheres com idade superior a 15 anos no mundo, as quais encontram-se em situação de risco para o desenvolvimento de câncer cervical. Estima-se que são realizados, anualmente, uma faixa de 527.624 diagnósticos de câncer de colo de útero no mundo, dos quais 265.672 acabam por ser fatais. O câncer cervical assume a quarta colocação entre as malignidades mais presentes entre mulheres no mundo (BRUNI et al., 2016).

O Papilomavírus é um DNA-vírus formado por capsídeo icosaédrico, não envelopado, capaz de infectar células epiteliais escamosas de tecido mucoso ou cutâneo e induzir lesões proliferativas. Já foram classificados aproximadamente 200 tipos de HPV, dos quais pelo menos 30 estão associados a infecções genitas (MÜNGER et al., 2004).

Estima-se que 30 a 60% da população sexualmente ativa possui infecção assintomática por HPV e que 50% das lesões são causadas por sorotipos envolvidos na gênese de tumores, considerados de alto risco oncogênico por causarem infecções persistentes, como 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 (TINDLE, 2002; GRAVITT, JAMSHIDI, 2005; SCHWARZ et al., 2009).

Para estabelecer infecções persistentes em epitélios estratificados, o HPV induz lesões proliferativas com baixo o número de cópias episomais nas células basais infectadas. Os produtos dos genes virais são capazes de alterar a expressão de genes e proteínas celulares, tais como Rb e p53, os quais alteram o ciclo celular. Durante infecções persistentes com cepas de alto risco oncogênico, principalmente dos tipos 16, 18 e 31, há o desenvolvimento de

mecanismos de escape da resposta imune, como a infrarregulação de genes Interferon-estimulados (ISGs), que comprometem a função antiviral dos Interferons (IFNs) (HONG et al., 2011; CHANG, LAIMINS, 2000; REISER et al., 2011).

A maior produção local de TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta), causada pela infecção, promove alterações genômicas que favorecem a transformação celular. As células infectadas com HPV também regulam negativamente a expressão de E-caderina, prejudicando a aderência de células dendríticas ao epitélio e impedindo seu amadurecimento, expressando indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO). Assim, ao atingirem órgãos linfóides periféricos, não podem estimular respostas de células T efectoras contra o HPV (MITTAL et al., 2013).

O diagnóstico das neoplasias do colo uterino é realizado a partir de achados citológicos e colposcópicos confirmados por exame histopatológico. A Terminologia do Sistema de Bethesda surgiu em 1992 para padronizar a nomenclatura citológica, sendo instituída a expressão lesão intraepitelial escamosa (SIL), dividida em duas classes de acordo com o grau da lesão: lesões de baixo grau (LSIL) e de alto grau (HSIL) (KURMAN, SOLOMON, 1994).

Em 2001 foram incluídas duas novas categorias: ASC-US (atipias de células escamosas de significado indeterminado) e ASC-H (atipia de células escamosas não podendo excluir lesão de alto grau) com a finalidade de incluir uma terminologia para alterações citológicas atípicas do colo uterino (SOLOMON et al., 2002).

A incidência do câncer de colo do útero pode ser reduzida por exames periódicos de Papanicolau e acompanhamento das lesões de pré-cancerosas. A triagem para HPV de alto risco encaminha cerca de 50% das pacientes para exames colposcópicos. Para diagnósticos repetitivos de ASCUS é indicado o acompanhamento com citologia e colposcopia (SOLOMON, 2003).

A acuidade diagnóstica é obtida pela combinação entre exames citológicos, colposcópicos e biópsia guiada. A colposcopia com biópsia dirigida tem sido o padrão para o diagnóstico e tratamento de lesões precursoras de câncer cervical, além de ser uma forte aliada ao diagnóstico histopatológico (LINDEQUE, 2005). Para lesões NIC III, o exame histopatológico é fundamental para um diagnóstico bem sucedido e tratamento subsequente (BAR-AM et al., 2000).

Na década de 1980, a biópsia dirigida por colposcopia diagnosticava mais de 90% dos casos de NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical) III e câncer. Atualmente, estudos mostram sensibilidade da biópsia dirigida por colposcopia de 50 a 65%. Isto indica que, na década de 1980, as clínicas de colposcopia eram procuradas por uma maioria de mulheres com NIC de

alto grau e atualmente já é possível acompanhar mulheres com NIC de baixo grau. Os programas de conscientização estão trazendo mais mulheres para o acompanhamento de lesões de baixo grau, facilitando assim o diagnóstico e o tratamento precoce (PRETORIUS , BELINSON, 2012).

Várias novas modalidades de tratamento têm sido propostas ao longo dos anos, dentre as quais destacam-se a conização, a histerectomia e, mais recentemente, a cirurgia de alta frequência (CAF). A escolha do tratamento adequado para NIC leva em consideração vários fatores, tais como a gravidade das lesões, a idade da paciente, a cogitação de opções reprodutivas pela paciente, a extensão da lesão na imagem colposcópica e a disponibilidade tecnológica do serviço médico. Em lesões NIC III a conização é frequentemente utilizada para tratar e excluir a presença de invasão (LINDEQUE, 2005).

Estudo realizado por Barker e colaboradores (2001) concluiu que mesmo com um atraso de 12 semanas para o tratamento eletrocirúrgico, o diagnóstico histopatológico guiado pela colposcopia não foi modificado. Maluf e colaboradores (2004) mostraram que a incidência de margem endocervical comprometida após conização é alta, bem como elevadas taxas de mitose estão associadas com uma maior recorrência de NIC III.

A CAF é considerada como tratamento de escolha para mulheres jovens que apresentaram colposcopia satisfatória. Estudo realizado por Murta e colaboradores (2004) demonstrou que a frequência de margens não comprometidas após CAF predominava em lesões localizadas no fundo do canal cervical. Portanto, este procedimento é o mais indicado para lesões no canal cervical.

Fatores ligados à neoplasia residual e recorrência de NIC III após CAF ou conização do colo uterino incluem a presença de margens cirúrgicas comprometidas, extensão às criptas e do número de mitoses. Contudo, a ausência destes fatores não assegura a eliminação de lesões residuais. Por esse motivo, o acompanhamento destas pacientes é de suma importância (MURTA et al., 1999; MALUF et al, 2004).

## **1.2 Atividade antitumoral dos Interferons e suas implicações na terapia clínica**

Interferons (IFNs) são citocinas pleiotrópicas (possuem efeitos múltiplos sobre diferentes células), com um vasto histórico de pesquisas científicas voltadas para o tratamento de tumores. Foram descobertos na década de 1950 e classificados inicialmente como proteínas produzidas por células do sistema imunológico em resposta a infecções virais (ISAACS, LINDENMANN, 1957).

Os IFNs são conhecidos por sua habilidade em induzir um estado ativado de células infectadas, possuindo importante característica de indução de fatores antivirais, interferindo em múltiplos estágios do ciclo de replicação viral, através de diversos mecanismos (YAN, CHEN, 2012). Além disso, possuem funções que influenciam a resposta imune inata e adaptativa, não somente em viroses, mas também em infecções bacterianas por *Micobacterium tuberculosis*, induzindo potente atividade antiproliferativa, essencial para o bloqueio do crescimento e imunosobrevivência de células tumorais (PANDEY et al., 2009).

A família dos IFNs é formada por três principais classes de citocinas (IFNs I, II e III), organizadas a partir de sua homologia estrutural e distintas entre si pela sequência de aminoácidos que formam cada molécula, pela natureza e distribuição dos respectivos receptores, pelas células capazes de produzi-las e pela indução de estímulos nas células-alvo (HERTZOG, WILLIAMS, 2013).

Os genes humanos dos IFNs do tipo I estão localizados no cromossomo 9p e codificam uma família de 17 proteínas distintas (incluindo 13 subtipos de IFN- $\alpha$ , além de IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\kappa$  e IFN $\omega$ ) que têm a propriedade de ligação ao seu receptor cognato, formado por duas subunidades: IFNR1 e IFNR2 (JAMES et al., 1991).

Existe apenas um tipo de IFNs II, denominado IFN- $\gamma$ , que se liga ao seu receptor cognato com duas subunidades: IFN $\gamma$ R1 e IFN $\gamma$ R2 (SHRODER et al., 2004).

Os IFNs do tipo III consistem em IFN $\lambda$ 1, IFN $\lambda$ 2 e IFN $\lambda$ 3 (também conhecidos como IL-29, IL-28A e IL-28B, respectivamente) e IFN $\lambda$ 4, que se ligam ao receptor IFN $\lambda$ 1 (IFNLR1) e à subunidade  $\beta$  do receptor de IL-10 (IL-10R $\beta$ ) (DONNELLY, KOTENKO, 2010).

A expressão dos IFNs dos tipos I e III é ativada pela via de receptores de reconhecimento de padrões, enquanto que a via dos IFNs do tipo II é induzida por mitógenos ou citocinas como a IL-12 e IL-18, que são expressas por linhagens de células T e NK (FEHNIGER et al., 1999).

Leucócitos especializados foram caracterizados por produzir ativamente IFN- $\alpha$  após o primeiro contato com vírus encapsulados, bactérias e células neoplásicas. Estas células, chamadas células produtoras naturais de IFN, possuem efeitos pleiotrópicos sobre outras células, como a suprarregulação de MHC de classe I em diversos tecidos, ativação de macrófagos e células NK, ativação e sobrevivência de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> (SIEGAL et al., 1999).

Uma das células produtoras naturais de IFN é a célula dendrítica plasmocitóide (pDCs). Elas possuem alta expressão basal de *Interferon Regulatory Factor 7* (IRF-7), um dos

membros da família de fatores de transcrição reguladores do IFN responsáveis pelo início dos processos celulares que culminam com ação antiviral: a produção de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  e a expressão de dois membros da família de receptores *Toll-like* (TLR): TLR7 e TLR9 (MARIÉ et al., 1998).

O conhecimento das vias de ativação que levam à produção de IFNs é importante devido à sua potente intervenção na regulação da tumorigênese. Constam estudos clínicos com IFN- $\alpha$  para imunoterapia de tumores desde a década de 1990, observados na Tabela 1, que resume diversas pesquisas realizadas com o objetivo de avaliar a eficácia da aplicabilidade da imunoterapia com IFN- $\alpha$  em diferentes tumores.

A imunoterapia associando IFN- $\alpha$  à IL-2 em 12 pacientes com tumores diversos (renais, pancreático, hepático, de trompas e melanoma) demonstrou significativo aumento da atividade citotóxica em células NK (FIORENTINO et al., 1992).

Quando o tratamento com IFN- $\alpha$  foi realizado de forma local em pacientes com tumores vesicais, com injeções semanais ao longo três meses antes da intervenção cirúrgica, foi observado um aumento significativo da resposta proliferativa frente à resposta proliferativa com fitohemaglutinina (PHA) em células mononucleares periféricas nos casos em que não havia evidência de recorrência da lesão (MOLTÓ et al., 1994).

Tabela 1 – Aplicabilidade da Imunoterapia com Interferon- $\alpha$ 

(continua)

<b>Pesquisadores</b>	<b>Ano</b>	<b>Patologia</b>	<b>Posologia</b>	<b>Tratamento Associado</b>	<b>Número de pacientes</b>	<b>Resultados</b>
FIorentino, B., et al	1992	Melanoma, Carcinoma de rim, pâncreas, fígado e trompas	$3 \cdot 10^6$ U/m <sup>2</sup> /dia, durante 5 dias consecutivos por seis semanas, intramuscular.	IL-2	12	Significante aumento da atividade citotóxica de células NK.
NATOLI, C., et al	1993	Câncer de mama e colorretal	$3 \cdot 10^6$ U/m <sup>2</sup> /dia, durante 3 dias consecutivos, intramuscular.	Não houve	62	Significante aumento da concentração do marcador tumoral 90K nas primeiras 24 horas após injeção de IFN- $\alpha$ .
MOLTÓ, L., et al	1994	Câncer de bexiga	$50 \cdot 10^6$ IU/m <sup>2</sup> , semanalmente, durante 3 meses, intravesical.	Não houve	17	Pacientes sem evidência de recorrência apresentaram significativo aumento da resposta proliferativa em células mononucleares periféricas.
KRUIT, W.H.J., et al	1995	Melanoma metastático	6 MIU/m <sup>2</sup> /dia, duas vezes por semana, durante 26 semanas, subcutâneo.	IL-2	57	Pacientes com resposta parcial totalizaram 16% e com resposta completa, 2%.
MOLTÓ, L., et al	1997	Câncer de bexiga	$50 \cdot 10^6$ IU/m <sup>2</sup> , semanalmente, durante 3 meses, antes da ressecção intravesical.	Não houve	17	Significante aumento da produção de IFN- $\gamma$ e redução de IL-4 em células mononucleares periféricas após 3 meses do tratamento com IFN- $\alpha$

Tabela 1 – Aplicabilidade da Imunoterapia com Interferon- $\alpha$ 

(continuação)

Pesquisadores	Ano	Patologia	Posologia	Tratamento Associado	Número de pacientes	Resultados
FLANIGAN, R.C., et al	2001	Carcinoma renal metastático	1,25x10 <sup>6</sup> U/m <sup>2</sup> /dia, aumentando 1 U por dia até alcançar 3,25 U/m <sup>2</sup> /dia, subcutâneo.	Cirurgia	246	Nefrectomia seguida por imunoterapia com IFN- $\alpha$ resultou no aumento da sobrevida dos pacientes, quando comparado com a imunoterapia somente.
MOTZER, R.J., et al	2001	Carcinoma renal avançado	PEG-IFN- $\alpha$ , 180 $\mu$ g/semana	Não houve	27	A dose de 450 $\mu$ g/semana por administração subcutânea foi melhor tolerada. Tem maior eficácia e menor toxicidade.
BUKOWSKI, R., et al	2002	Melanoma, Carcinoma de rim, pâncreas, fígado e estômago	PEG-IFN- $\alpha$ 2b, 0,75 a 7,5 $\mu$ g/semana, por 12 semanas, subcutâneo.	Não houve	35	PEG-IFN- $\alpha$ 2b foi ativo e bem tolerado em pacientes com tumores sólidos metastáticos, com doses superiores a 6,0 $\mu$ g/kg/semana.
ROOZENDAAL, K.J., et al	2003	Alveolar sarcoma	3.10 <sup>6</sup> IU/ dia, durante 8 meses, subcutâneo.	Não houve	1	Após 3 meses de tratamento houve regressão parcial das metástases pulmonares e diminuição da massa tumoral originária.
MICHALLET, M., et al	2004	Leucemia mielogênica crônica	Grupos randomizados: PEG-IFN- $\alpha$ 2b (6 $\mu$ g/Kg/semana) e IFN- $\alpha$ 2b (5 MUI/m <sup>2</sup> /dia), por 6 meses, subcutâneo.	Não houve	344	Não houve diferenças significantes entre o tratamento com PEG-IFN- $\alpha$ 2b e IFN- $\alpha$ 2b.



Tabela 1 – Aplicabilidade da Imunoterapia com Interferon- $\alpha$ 

(continuação)

Pesquisadores	Ano	Patologia	Posologia	Tratamento Associado	Número de pacientes	Resultados
KAUFMANN, R., et al	2005	Melanoma metastático	TMZ sozinha (200 mg/m <sup>2</sup> /dia; dia 1 até 5 a cada 28 dias) ou combinada com IFN- $\alpha$ (5 MU/m <sup>2</sup> ; dias 1, 3 e 5 por semana), subcutâneo.	Temozolomida	294	O tratamento com TMZ+IFN- $\alpha$ aumenta significativamente a resposta objetiva ao tratamento, quando comparado ao tratamento com TMZ apenas.
OBI, S., et al	2005	Carcinoma hepatocelular	5.10 <sup>6</sup> U/nos dias 1, 3 e 5 por semana, intramuscular	5-Fluoracil	116	Dezenove pacientes mostraram resposta completa e quarenta e dois, parcial. A terapia combinada foi segura e aumentou a taxa de sobrevida dos pacientes com resposta completa.
BROCKMEYER, N.H., et al	2006	<i>Condylomata acuminata</i> em pacientes HIV positivos	80 $\mu$ g de PEG-IFN- $\alpha$ / semana durante 24 semanas	Terapia anti-retroviral	22	PEG-IFN é uma terapia eficaz e segura para pacientes com HIV. Quatro pacientes tiveram remissão total, quatro pacientes tiveram resposta parcial.
PUCCHIO, T., et al	2006	Melanoma	3 MU	Melan-A/MART-1:26-35 (27 L), gp100:209-217(210 M)	7	Quatro pacientes mostraram aumento da sobrevida e maior capacidade de apresentação de antígenos após o tratamento.

Tabela 1 – Aplicabilidade da Imunoterapia com Interferon- $\alpha$ 

(conclusão)

Pesquisadores	Ano	Patologia	Posologia	Tratamento Associado	Número de pacientes	Resultados
BOTTOMLEY, A., et al	2009	Melanoma	PEG-IFN- $\alpha$ -2b 6 $\mu$ g/kg/semana, subcutâneo por 8 semanas, 3 $\mu$ g/kg/semana por 5 anos.	Não houve	1256	Houve uma melhora da sobrevida livre de doença, porém o questionário sobre qualidade de vida mostrou efeitos negativos, por exemplo em sintomas como dispnéia, perda de apetite e fadiga.
MOTZER, R.J., et al	2009	Carcinoma renal metastático	3 MU, 3 vezes por semana na 1ª semana, 6 MU na 2ª semana e 9 MU na 3ª semana.	Sunitinib	750	Pacientes em tratamento com Sunitinib mostraram maior tempo de sobrevida comparado ao IFN- $\alpha$ .
HAULCHILD, A. et al	2009	Melanoma	Grupo alta dose: 10 MU/m <sup>2</sup> , I.V, 5x /semana, por 2 semanas; 10 MU/m <sup>2</sup> , subc, 5 x semana, por 2 semanas; 3 MU, subc, 3 x /semana, por 23 meses. Grupo baixa dose: 3MU, 3 x/semana, durante 24 meses.	Não houve	674	O aumento da dose durante 4 semanas antes do tratamento de baixa dose por 2 anos não resultou em aumento da sobrevida livre de doença no grupo alta dose.
ESCUDIER, B.; et al	2009	Carcinoma renal metastático	9 MU, 3x/semana, subcutâneo	Sorafenib	189	Sorafenib resultou em similar progressão livre de doença quando comparado ao IFN- $\alpha$ .

Fonte: Autoria própria.

### 1.3 Propriedades químicas e características biológicas do PEG Intron

A técnica de peguilação de proteínas tem sido desenvolvida para a modificação de uma variedade de proteínas com aplicabilidade clínica, dentre as quais ressaltam-se, a título de exemplo, a Adenosina-deaminase, L-asparaginase, IL-2, GMCSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  e hormônio do crescimento (DELGADO et al., 1992).

Os resultados das pesquisas são promissores, pois a peguilação pode, além de reduzir a imunogenicidade da proteína, aumentar o tempo de ação da mesma. Além disso, possuem atividade farmacológica mais potente que as originais, como o TNF- $\alpha$  e o hormônio do crescimento (TSUNODA et al., 1999; CLARK et al., 1996).

O PEG Intron (Pegylated Interferon-Alpha-2b ou IFN- $\alpha$ -2b; Schering-Plough, Kenilworth, NJ) é um composto derivado do IFN- $\alpha$  2b recombinante, sendo caracterizado pela presença de uma única cadeia da molécula de Polietilenoglicol (PEG), com peso molecular de 12 KDaltons, ligado ao IFN- $\alpha$ 2b através de uma ligação covalente à histidina-34 (WANG et al., 2000).

A peguilação do IFN- $\alpha$  2b não compromete sua estrutura terciária ou seu espectro de atividade, mas reduz significativamente a depuração da molécula, aumentando em até 10 vezes sua meia-vida plasmática. Consequentemente, torna-se possível uma administração semanal do PEG Intron, do que decorre uma ampliação da exposição à droga sem o consequente incremento proporcional da toxicidade (GLUE et al., 2000).

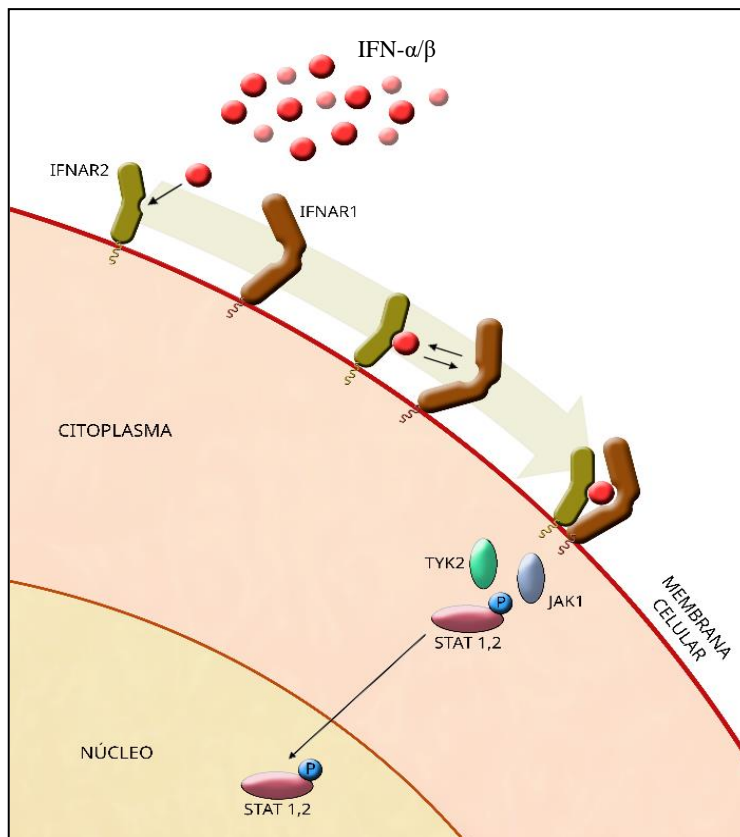
As propriedades químicas do PEG Intron dependem do peso molecular da estrutura linear e química da molécula ligante. Espécies com alto peso molecular resultam em uma meia-vida mais longa. A estrutura da cadeia PEG pode afetar a potencialidade, estabilidade e o acúmulo da droga no organismo. Estruturas com baixa absorção na corrente sanguínea podem resultar em extensão do tempo para a máxima concentração no soro. Estudo de Truitt e colaboradores (1994) mostrou que existe uma relação positiva entre a meia-vida dos IFNs peguilados e suas atividades antivirais.

O aminoácido ao qual a estrutura química PEG está ligada pode afetar a potencialidade do IFN, se a molécula PEG interferir na ligação com seu receptor ou mudar sua estrutura proteica. A estrutura química do PEG Intron é importante para o desenvolvimento de uma molécula capaz de manter a duração de sua atividade farmacológica durante uma semana, sem comprometer significativamente a potência ou alterar a atividade biológica do PEG Intron se comparada ao IFN- $\alpha$  2b sozinho (WANG et al., 2000).

## 1.4 Receptores de Interferon- $\alpha$ e suas vias de ativação

Interferons do tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ ) induzem a expressão de vários genes estimulados por IFN (ISGs), responsáveis pela regulação do crescimento celular, efeitos antivirais e imunomoduladores. Células infectadas por vírus podem inibir a replicação viral, além de exercerem funções citotóxicas, antiproliferativas e regular negativamente a angiogênese. Outra propriedade importante dos IFNs é a de ativar células do sistema imune para prevenir lesões teciduais (GOUBAU et al., 2009).

Os IFNs do tipo I estimulam a fosforilação de fatores de transcrição nas células-alvo após a ligação com receptores de superfície que são membros da família de receptores de citocinas classe II, formados por duas subunidades: IFNR1 e IFNR2 (STARK et al., 1998).



**Figura 1.** Processo de fosforilação do STAT1 e STAT2. **Fonte:** Autoria própria.

A ilustração à esquerda demonstra o processo de fosforilação do STAT1 e do STAT2, o qual tem início com a introdução de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  no organismo do indivíduo, que reagirá com os receptores 1 e 2 (respectivamente, IFNAR1 e IFNAR2), os quais se ligarão sobre a superfície da membrana celular.

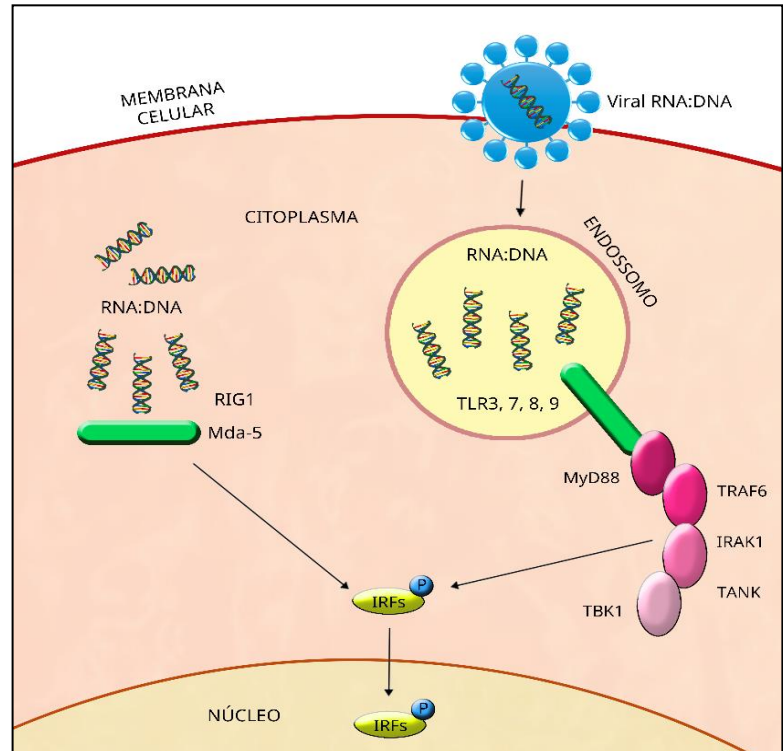
Uma vez vinculados, os Interferons e seus receptores darão início a uma cadeia química (TYK2, JAK1, STAT1, STAT2) que, ao final, serão fosforilados.

O produto da reação ocorrida no citoplasma se deslocará para o núcleo da célula, conforme ilustrado na Figura 3, o qual se combinará com o Interferon Regulatory Factor (IRF) fosforilado cuja cadeia de produção pode ser observada na Figura 2.

A infecção pelo HPV pode desencadear uma resposta antiviral com a consequente produção de IFN- $\alpha/\beta$ . O bloqueio das vias de ativação dos IFN tipo I é um mecanismo de evasão do sistema imune, causado pelas proteínas do HPV, podendo ocorrer perda epissomal

do HPV, favorecendo o surgimento de células com genomas integrados ao vírus. Estas células podem exibir maior expressão de E6 e E7, com consequente crescimento e vantagem competitiva (BOCCARDO et al.; 2010).

Uma vez que o vírus infiltra uma célula, via endocitose, mediada por receptor, o Gene Induzível por Retinol I (RIG-I) é estimulado pela presença de Ácido Desoxiribonucléico (DNA) viral. Adicionalmente, a proteína associada à diferenciação de melanoma (MDA5) e o receptor endossomal TLR-3 reconhecem os intermediários de cadeia dupla gerados durante a replicação do vírus da dengue.



**Figura 2.** Vias de sinalização dos IRFs. **Fonte:** Autoria própria.

Estas vias são sinalizadas através de IRF-3 e 7, sendo responsáveis por dar início a uma cascata de sinais que resultam na transcrição do IFN tipo I (NASIRUDEEN et al., 2011).

A interação do IFN- $\alpha$  com seu receptor deflagra em uma série de eventos de fosforilação, como a ativação do receptor associado às proteínas Janus kinase (JAK) e Tyrosine kinase (TYK), que promovem a transdução de sinal e a ativação da transcrição das proteínas STAT (DARNELL et al., 1994).

A via clássica de indução por IFN- $\alpha/\beta$  é mais estudada em fibroblastos. Após a ligação ao receptor, ocorre a fosforilação do complexo de proteínas STAT-1 e STAT-2 com o Fator Regulador de Interferon 9 (IRF-9) e migração para o núcleo da célula. Este fator transcricional multimérico liga-se ao Elemento de Resposta Estimulada por Interferon (ISRE), nos promotores dos genes responsivos ao IFN- $\alpha$  para a síntese de proteínas efetoras (LEVY, 1995; IHLE, KERR, 1995; SOLIS et al., 2006).

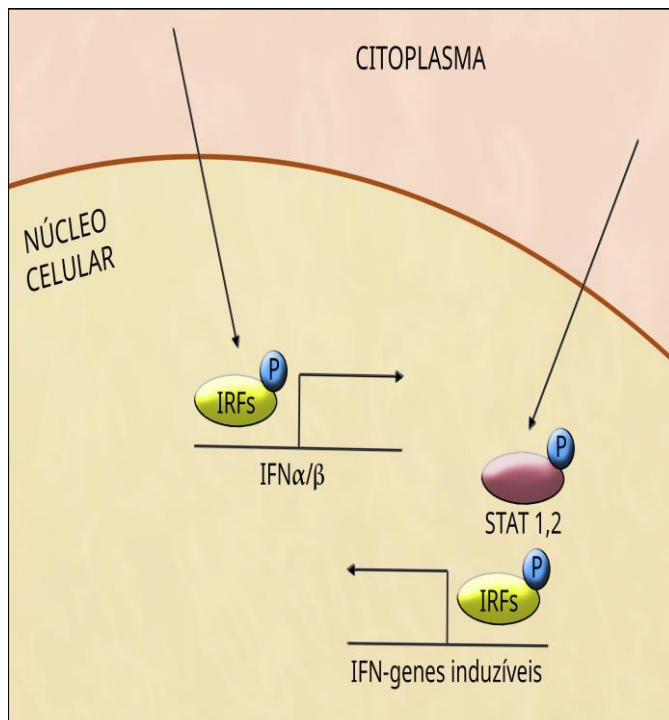
Receptores de IFN $\alpha/\beta$  ativam componentes transdutores de sinal e ativadores de transcrição da via de sinalização JAK-STAT, provocando a formação de dois complexos do fator de transcrição: STAT-1 e STAT2, que interagem com IRF-9 para formar o Fator 3 do Gene Estimulado por IFN (ISGF3) (DUPUIS et al., 2003).

Estudo realizado por Müller e colaboradores (1993) concluiu que células deficientes em JAK-1 e TYK não são responsivas ao IFN- $\alpha/\beta$ , mostrando a importância destes fatores na via de ativação.

A resposta aos IFNs do tipo I pode ser desencadeada em diversas células, por detecção citosólica de infecção viral ou, em células dendríticas plasmocitóides diferenciadas, pelo Receptor *Toll-like* 9 (TLR9). O acúmulo de RNA ou DNA viral pode ser reconhecido por TLRs em endossomos. O reconhecimento conduz a uma cascata de eventos de transdução de sinal, o que resulta na fosforilação de fatores de transcrição (fatores reguladores de IFN) e indução de genes de IFN tipo I. O Interferon secretado é reconhecido por receptores de Interferon (IFNARs) I e II que conduzem uma cascata de sinalização para ativar genes Interferon-induzidos (ALARCÓN-RIQUELME, 2006).

Quando qualquer alteração na expressão de genes acontece devido à infecção viral, não há modulação de receptores de citocinas e enzimas que controlam a função da célula. Essas alterações podem influenciar a diferenciação, a taxa de proliferação celular e apoptose, bem como a responsividade ao IFN- $\alpha$  (NOMELINI et al., 2007).

O perfil transcricional de células estimuladas por IFN- $\alpha$ , principalmente células NK, linfócitos T e monócitos, pode ser afetado por vários fatores, entre eles a duração da estimulação, o tipo celular e o método de exposição à citocina (ZIMMERER et al., 2008).



**Figura 3:** Ativação de genes induzíveis por IFN- $\alpha/\beta$ .

**Fonte:** Autoria própria.

A busca da caracterização das vias de sinalização do IFN- $\alpha$  levou à descoberta de uma família de fatores de transcrição que associam diretamente os receptores de superfície celular aos eventos nucleares. Estas proteínas, denominadas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição, residem fora do núcleo das células e, após estimulação com IFN, tornam-se ativadas por fosforilação da tirosina, translocando-se para o núcleo, onde reconhecem sequências reguladoras de DNA (LEVY, DARNELL, 1990) (Figura 3).

Um destes transdutores de sinal e ativadores de transcrição é o STAT: uma família de proteínas citoplasmáticas latentes que são ativadas para participar no controle de genes quando as células encontram polipeptídeos extracelulares. Experiências genéticas com camundongos definiram papéis cruciais para cada STAT conhecida em mamíferos. A descoberta de uma STAT em *Drosophila* mostrou que há uma origem evolutiva antiga para essa proteína (DARNELL, 1997).

A ativação da via de sinalização JAK/STAT constitui um mecanismo regulador importante pelo qual as células hospedeiras inibem infecções virais. Os ativadores transcricionais centrais da presente via são as proteínas STAT: 1, 2, e 3, que atuam como importantes reguladores do sistema imune inato a infecções provocadas por uma variedade de RNA e DNA vírus. O HPV suprime a expressão constitutiva de STAT-1, mas não de STAT-2, IRF-9 ou STAT-3 (CHANG, LAIMINS, 2000; HONG et al., 2011).

Outro transdutor de sinal é o IRF-7, uma proteína multifuncional com atividade transcricional dependente de fosforilação C-terminal. A expressão constitutiva de IRF-7 é restrita aos linfócitos B e células dendríticas. Porém em outras células, sua produção é induzida por infecção viral e por IFN- $\alpha/\beta$ . O IRF-7 contém vários domínios de regulação da região C-terminal, principalmente entre os aminoácidos 471 e 487, alvo da fosforilação induzida por vírus e possui uma meia-vida de trinta minutos (HISCOTT, 2007).

Os complexos formados IRF-3 / IRF-7 são biologicamente ativos e estão envolvidos na transcrição de genes ativados por IFN- $\alpha$  endógeno. A produção de IFN- $\alpha/\beta$  após a infecção depende da ativação de IRF-3 e IRF-7, que são fosforilados pelas quinases TBK-1 e IKK $\epsilon$  após infecção viral e sinalização pelos Receptores de Reconhecimento de Padrão (RRP), levando à sua dimerização, translocação nuclear e de ligação aos genes promotores de IFN tipo I, induzindo sua ativação (GOUBAU et al.; 2009).

Existem diversos fatores de escape produzidos por vírus capazes de inibir a via de ativação do IFN. Análises comparativas de transcrição de ISGs em queratinócitos na presença de infecção por HPV 16, 18 e 31 revelou que genes antivirais (IFIT-1 e MX-1), genes envolvidos na sinalização de IFN (STAT-1), genes proapoptóticos (TRAIL e XAF-1) e receptores de reconhecimento de patógenos (TLR3, RIG-1, e MDA-5) estão inibidos (REISER et al, 2011).

A expressão de STAT-1 é suprimida por proteínas do HPV a nível transcricional. As oncoproteínas E6 e E7, independentemente, suprimem a expressão de STAT-1, necessária para a amplificação do genoma e manutenção de episomas, sugerindo um papel importante para a atividade na patogênese viral (HONG et al., 2011).

A sinalização ativada por Ras - uma família de pequenas proteínas de ligação a GTP codificadas pelos oncogenes Ras que acoplam receptores de fator de crescimento a alvos intracelulares - inibe fatores de transcrição necessários para a sinalização por IFNs, incluindo STAT-1, STAT-2, IRF-1 e IRF-9. Isto indica que Ras modula a responsividade das células para IFNs e sugere que pode promover a tumorigênese, limitando a atividade dos fatores de crescimento através da modulação da capacidade de resposta das células aos reguladores negativos, tais como o TGF- $\beta$  (KLAMPFER et al., 2003).

Estudo realizado por Li e colaboradores (1999) concluiu que a capacidade de ligação ao DNA e de transativação de ISGF3 estão diminuídas em células expressando proteína E6 HPV-18 após tratamento com IFN, resultado da diminuição da fosforilação de Tyk 2, STAT-2 e STAT-1. Este fato é explicado devido às proteínas E6 do HPV-18 interagirem fisicamente com TYK-2, que requer domínios JH6 e JH7, importantes para a ligação de Tyk 2 com a porção citoplasmática do IFNAR1, inibindo a via de ativação do IFN (RICHTER et al., 1998).

### **1.5 Plasticidade na diferenciação dos linfócitos TCD4+**

A detecção de patógenos infecciosos pelo hospedeiro deflagra eventos sucessivos que resultam no recrutamento e diferenciação de linfócitos T, que possuem funções adequadas para conter o patógeno. A resposta inicial das células T efetoras é seguida por células T regulatórias (Treg), necessárias para limitar o potencial dano tecidual advindo de uma resposta imune exacerbada (JOSEFOWICZ; RUDENSKY, 2009).

O equilíbrio entre células efetoras e regulatórias acontece através do infiltrado de células T pré-diferenciadas no tecido, por indução de perfis de células T efetoras e regulatórias ou por redirecionamento do programa de diferenciação das células T, que requer plasticidade na regulação de alvos transcripcionais. Estes estão sendo estudados recentemente por representar, para o hospedeiro, a flexibilidade de transferir recursos para a eliminação de patógenos (ZHOU et al., 2009).

Na presença de citocinas produzidas por células da imunidade inata, os linfócitos T auxiliares são capazes de diferenciarem-se em células com funções e perfil de citocinas próprias. Os primeiros perfis de linfócitos T helper a serem descritos foram Th1 e Th2. As células Th1 secretam principalmente Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e são essenciais para a imunidade contra microorganismos intracelulares. Já os linfócitos Th2, que secretam IL-4, IL-5 e IL-13, são importantes para a proteção contra parasitas e patógenos extracelulares (MOSMANN et al., 1986).



As células T auxiliares da subpopulação Th17 foram descritas por produzirem IL-17, IL-21 e IL-22, que protegem o hospedeiro contra infecções bacterianas e fúngicas. A diferenciação Th17 é iniciada pela combinação do fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e IL-6 ou IL-21, que induz a expressão do fator de transcrição ROR $\gamma$ t e do receptor de IL-23 (IVANOV et al., 2006).

O recrutamento intratumoral de células Th17 depende do microambiente tumoral, que inclui a produção de várias quimiocinas - tais como CCL20, CCL17, CCL22, MIF, RANTES e CCL4 - a presença de fibroblastos ativados, células dendríticas e macrófagos produtores de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 e TGF- $\beta$  (CHEN et al., 2012).

As células Th17 são frequentemente associadas a tumores, sendo descritas em diversos modelos de melanoma, tumores de mama, cólon, ovário e pâncreas, acumulando-se especificamente em tumores, quando comparados a tecidos saudáveis. Diversas pesquisas demonstram um recrutamento específico de células Th17 pelo próprio microambiente tumoral. No entanto, há ainda algumas lacunas em como as células Th17 são induzidas, recrutadas, expandidas ou convertidas em Tregs nos tumores (SU et al., 2010).

## 2 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de lesões tumorais, bem como a construção de protocolos de tratamento efetivos são questões que têm recebido uma profunda atenção por parte da comunidade científica, notadamente em virtude da gravidade que tal problemática assume nos dias atuais.

É fato que o sistema imunológico humano conta com os requisitos necessários para a eliminação de células tumorais; todavia, o fenótipo imunogênico destas possui a capacidade de produzir mecanismos de escape.

Referidas interações imunes – que conforme Eisenring e colaboradores (2010) manifestam como principal fator controlador as citocinas – têm sido objeto de inúmeros estudos, dentre os quais é possível destacar aqueles relacionados ao câncer cervical, o qual afigura-se atualmente como a quarta malignidade mais frequente entre as mulheres no mundo (BRUNI et al., 2016), caracterizado por um alto índice de mortalidade, bem como os relacionados ao HPV, o qual apresenta-se como um dos principais fatores causadores daquele.

O HPV, em função de diversos fatores, possui grande habilidade em escapar do sistema imune (GRAVITT e JAMSHIDI, 2005), e da inexistência de uma resposta efetiva decorre o surgimento de uma infecção que, com o transcurso do tempo, dará lugar à neoplasia intraepitelial cervical, causa conhecida do câncer cervical uterino.

Segundo Tindle (2002), a dificuldade do organismo em combater o HPV deve-se, por um lado, à localização do vírus, o qual instala-se na camada basal do epitélio, do que decorre a dificuldade de acesso por parte das células apresentadoras de antígeno (APCs) e, por outro, pelo fato de não ocorrer a lise de queratinócitos, dificultando-se a resposta imune local.

A NIC tem sido objeto de diversas espécies de tratamentos cirúrgicos, a exemplo da conização, do CAF (cirurgia de alta frequência) e da histerectomia. Todavia, conforme destacado por Delorenzo e colaboradores (2009), tem sido observada uma alta taxa de recorrência da doença após mencionados procedimentos, realidade diante da qual pesquisadores do mundo inteiro têm dedicado seus trabalhos no sentido de orientar e estimular a consolidação de políticas de saúde e estratégias secundárias que colaborem para a prevenção, o diagnóstico e o tratamento precoce do câncer cervical.

É neste cenário que o potencial da imunoterapia, enquanto modalidade de tratamento, tem sido cada vez mais reconhecido, seja mediante sua aplicação em paralelo ao procedimento cirúrgico, seja de forma apartada deste.

A imunoterapia inclui, atualmente, a aplicação de vacinas, proteínas recombinantes virais, anticorpos monoclonais, citocinas e células dendríticas (MICHELIN, MURTA, 2008).

Dentre as citocinas, assumem relevância os Interferons, enquanto glicoproteínas secretoras induzíveis que, além de possuir efeitos antivirais, imunomoduladores, antiangiogênicos e antiproliferativos, assumem grande potencial decorrente de seu efeito antitumoral, o qual vem sendo tratado em diversos estudos sobre a matéria.

Justifica-se assim que o presente estudo busca uma melhor elucidação dos mecanismos imunológicos que desencadeiam a responsividade de pacientes acometidos de Neoplasia Intraepitelial, em seus graus II e III, diante da aplicação de tratamento com Alfafequinterferona 2b, em colaboração à ciência mundial na busca por novos caminhos para o tratamento de lesões tumorais, principalmente no que concerne ao desenvolvimento de protocolos de tratamento mais eficientes com IFN- $\alpha$  em pacientes com NIC.

### **3 PROPOSIÇÃO**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

Analisar a responsividade sistêmica da imunidade celular frente ao IFN- $\alpha$ , em pacientes com Neoplasia Intraepitelial tratadas com Alfapeguinterferona.

Realizar a análise da resposta imune sistêmica frente à imunoterapia, através da avaliação dos receptores de IFN- $\alpha$  e das vias de ativação celular pelo IFN- $\alpha$  (STAT-1 e IRF-7) no sangue periférico de pacientes com Neoplasia Intraepitelial tratadas com Alfapeguinterferona, avaliando linfócitos T auxiliares (CD3+, CD4+), citotóxicos (CD8+) e macrófagos (CD14+).

Comparar a plasticidade de linfócitos T tecidual, antes e após a imunoterapia em pacientes que obtiveram regressão da lesão com pacientes que não obtiveram regressão da lesão.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Avaliar a integridade da via de ativação do IFN- $\alpha$  em linfócitos T auxiliares, citotóxicos e macrófagos, nestas pacientes, através dos receptores IFNR1 e IFNR2, bem como dos fatores de transcrição STAT-1 e IRF-7.

Avaliar a expressão local dos receptores de IFN- $\alpha$  e do IFN $\alpha$ , comparando a responsividade sistêmica à responsividade tecidual frente à neoplasia intraepitelial.

Analisar a expressão local de IFN- $\alpha$  e dos IFNR1 e IFNR2 por qPCR, comparando a pré-terapia com a pós-terapia através dos cálculos de  $\Delta\Delta Ct$ .

Realizar a análise da plasticidade de linfócitos T no tecido lesionado, comparando a pré-terapia com a pós-terapia, através da avaliação dos fatores de transcrição relacionados à resposta Th1 (T-bet) e Th17 (ROR $\gamma$ T).

## 4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo prospectivo comparativo que visa analisar a resposta local e sistêmica de pacientes submetidas ao tratamento com Alfapeginterferona-2b, atendidas no setor de Colposcopia, da disciplina de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), no Ambulatório Maria da Glória. Todos os experimentos foram realizados no Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da UFTM.

### 4.2 Casuística

Dezoito pacientes, com idades entre 18 e 82 anos de idade, com diagnóstico de NIC II-III, que não haviam recebido qualquer tratamento prévio foram convidadas a participar do estudo. Todas as participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial foi confirmado por exame histopatológico, realizado no serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital de Clínicas da UFTM.

**Tabela 2 – Características clínicas, diagnóstico antes e após a imunoterapia com IFN- $\alpha$  2b peguilado.**

Paciente	Idade	Fumante	Diagnóstico Inicial	Diagnóstico Final	Conclusão diagnóstica
1	36	Não	NIC III	Epitélio Normal	Regressão
2	82	Não	NIC III	NIC III	Sem resposta
3	54	Não	NIC III	Epitélio Normal	Regressão
4	28	Não	NIC II	Epitélio Normal	Regressão
5	32	Não	NIC III	NIC III	Sem resposta
6	35	Não	NIC III	NIC III	Sem resposta
7	18	Não	NIC II	NIC II	Sem resposta
8	34	Não	NIC II	NIC II	Sem resposta
9	38	Não	NIC III	NIC II	Regressão
10	37	Não	NIC III	NIC III	Sem resposta
11	34	Não	NIC III	NIC II	Regressão
12	47	Não	NIC III	Epitélio Normal	Regressão
13	26	Não	NIC III	Epitélio Normal	Regressão
14	24	Sim	NIC II	NIC II	Sem resposta
15	28	Sim	NIC II	Epitélio Normal	Regressão
16	60	Não	NIC III	NIC III	Sem resposta
17	42	Não	NIC III	NIC III	Sem resposta
18	33	Não	NIC III	NIC III	Sem resposta

#### *4.2.1 Aspectos Éticos*

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, sob o número 1525 (ANEXO A). As pacientes ou o familiar responsável assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B).

#### *4.2.2 Critérios de Inclusão*

Foram incluídas neste estudo, pacientes que apresentaram lesões cervicais alto grau aos exames citológico e colposcópico, com lesões maiores que um centímetro, posteriormente confirmadas por análise histopatológica, que concordaram em participar do estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre após esclarecimento. Também foram critérios de inclusão: ausência de sangramento durante os exames e de uso de antibióticos orais, fungicidas vaginais ou cremes nos últimos 30 dias.

#### *4.2.3 Critérios de Exclusão*

Foram excluídas deste estudo, pacientes que apresentaram ausência de lesão visível ao exame colposcópico ou menor que 1 cm; gestantes; pacientes com cardiopatia grave ou com comprometimento das funções hepática ou renal. Pacientes com: doenças autoimunes, imunossupressão, imunodepressão, histórico prévio de intolerância ao IFN- $\alpha$  ou que não concordaram em participar da pesquisa também foram excluídas do estudo.

#### *4.2.4 Aplicação do Interferon- $\alpha$ Peguilado*

O tratamento foi realizado com o fármaco PEGInterferon- $\alpha$  2b humano recombinante (Pegintron®; 118,4 mcg), aplicado por via subcutânea, na região abdominal, na dose de 80  $\mu$ g (pó liofilizado diluído em 0,7 mL de diluente antes de cada aplicação). As aplicações foram realizadas semanalmente, uma aplicação por semana, durante seis semanas.

#### *4.2.5 Avaliação da resposta clínica ao tratamento*

As pacientes avaliadas neste estudo foram acompanhadas através dos exames: clínico colposcópico e histopatológico. Desta forma, se ao exame colposcópico houve o

desaparecimento ou a diminuição da lesão, confirmada por exame histológico, com regressão para NIC I ou sem alterações sugestivas de HPV, o tratamento foi considerado como satisfatório e bem-sucedido, caracterizando o grupo como responsivo. As pacientes foram submetidas a acompanhamento com colposcopia e citologia a cada 6 meses.

Se não houve regressão da lesão, observado por exame colposcópico e confirmada a persistência da lesão NIC II ou III em biópsias, foi considerado falha do tratamento, incluindo a paciente no grupo não responsivo. Todas as pacientes com NIC II e III foram indicadas à conização ou CAF.

### 4.3 Análise Celular por Citometria de Fluxo

O sangue periférico foi colhido em 2 tubos a vácuo contendo o anticoagulante EDTA (ácido etileno tetra-acético), equivalente a aproximadamente 10 mL de sangue por paciente, antes do início do tratamento (pré-terapia), bem como na 3<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> aplicações.

Para a obtenção de leucócitos, o sangue total foi transferido para tubos cônicos de 50 mL, adicionando-se solução de lise de hemácias na proporção de 1:10 (BD *Biosciences - FACS Lysing Solution*), para a separação das células imunológicas. Após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente, centrifugou-se o material durante 10 minutos, em uma rotação de 2.000 g, a 4° C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, de forma a manter o precipitado de células ao fundo do tubo cônico. Repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições, por duas vezes, para a retirada do excesso da solução de lise, adicionando 30 ml de PBS (solução salina tamponada com fosfato) às células ressuspensas a cada centrifugação.

Ao final da segunda centrifugação, retira-se o PBS, deixando aproximadamente 1mL ao precipitado de células, para acrescentar 2 uL da proteína transportadora inibitória (BD Golgistop). Para cada 1 mL de sangue lisado, utilizou-se 1µL da proteína transportadora inibitória. Incubou-se por 20 minutos, a 4°C, ao abrigo da luz. As células foram lavadas por centrifugação, nas mesmas condições anteriores, com 15 mL de PBS, para retirar o excesso de proteína.

Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante, conservando-se apenas o precipitado de células, que foram ressuspensas em 1 mL de PBS. Em seguida, transferiu-se 20µL das células ressuspensas para tubos Eppendorf contendo 180µL de solução de Turk, para determinar a quantidade de células obtidas. As células foram contadas ao microscópio óptico, em câmara de Neubauer.

A suspensão de células foi transferida para tubos de ensaio sendo, primeiramente, realizada a marcação extracelular, sendo distribuídos da seguinte forma: dois tubos para os isotipos controles, cinco para linfócitos T CD3+, cinco para linfócitos T CD4+, cinco para linfócitos TCD8+ e cinco para macrófagos (Tabela 3).

O anticorpo utilizado para a marcação de membrana (extracelular) do isotipo controle foi o  $\alpha$ -IgG2a FITC BD (FITC - *Fluorescein Conjugate*). Para a marcação de membrana dos linfócitos T CD3+ utilizou-se o anticorpo  $\alpha$ -CD3 FITC BD; para os linfócitos T CD4+,  $\alpha$ -CD4 ALEXA BD, para os linfócitos T CD8+,  $\alpha$ -CD8 FITC BD e para os macrófagos,  $\alpha$ -CD14 APC BD. Após a primeira marcação, incubavam-se as células a 4°C por 30 minutos, ao abrigo da luz.

Em seguida, eram realizadas duas lavagens das células com PBS, intercalando centrifugações a 2000g, por 10 minutos a 4°C, para a remoção do excesso de anticorpos. Posteriormente, as células eram preparadas para a marcação intracelular, adicionando-se solução de permeabilização e fixação (BD Cytotfix/Cytoperm) e incubando-se a 4°C por 20 minutos, ao abrigo da luz. Lavou-se as células com solução tampão (BD Perm/Wash Buffer) por duas vezes, intercalando centrifugações nas mesmas condições anteriormente citadas.

A marcação intracelular foi realizada com os seguintes anticorpos, cuja sequência repetia-se para cada marcação extracelular: IFNR1, IFNR2,  $\alpha$ -STAT1 PE BD,  $\alpha$ -IRF7 PE BD,  $\alpha$ -IFN- $\alpha$  PE BD. Os isotipos controles foram:  $\alpha$ -IgG1 PE BD e  $\alpha$ -IgG2a PE BD. Após incubação de 30 minutos, a 4°C, ao abrigo da luz, as células eram lavadas com solução tampão (BD Perm/Wash Buffer) duas vezes, intercalando centrifugações nas mesmas condições. Por fim, as células eram ressuspensas em 500  $\mu$ L de PBS para a leitura no citômetro BD FACSCalibur.

Os experimentos foram realizados através do aparelho FACS Calibur, BD Bioscience. Os dados obtidos de % de Gate e Intensidade de Fluorescência foram obtidos através do software CellQuest, BD Bioscience. O índice de comparação da % de Gate e Intensidade de Fluorescência entre a 3ª e 6ª aplicações com a pré-terapia de cada paciente foi calculado através da construção de planilhas e fórmulas no software Excel, Microsoft Office.



**Tabela 3 – Marcações extracelulares e intracelulares para citometria de fluxo**

<b>Tubos</b>	<b>Descrição</b>	<b>Marcação Extracelular</b>	<b>Marcação Intracelular</b>	<b>Isotipo Controle</b>
1	Isotipo 1	$\alpha$ -IgG2a FITC	$\alpha$ -IgG1 PE	–
2	Isotipo 2	$\alpha$ -IgG2a FITC	$\alpha$ -IgG2a PE	–
3	Linfócitos Totais e Linfócitos T Auxiliares	$\alpha$ -CD3 FITC + $\alpha$ -CD4 ALEXA	IFNR1 PE	ISO 2
4		$\alpha$ -CD3 FITC + $\alpha$ -CD4 ALEXA	IFNR2 PE	ISO 2
5		$\alpha$ -CD3 FITC + $\alpha$ -CD4 ALEXA	$\alpha$ -STAT 1 PE	ISO 2
6		$\alpha$ -CD3 FITC + $\alpha$ -CD4 ALEXA	$\alpha$ -IRF 7 PE	ISO 2
7		$\alpha$ -CD3 FITC + $\alpha$ -CD4 ALEXA	$\alpha$ -IFN- $\alpha$ PE	ISO 2
8	Linfócitos T Citotóxicos e Macrófagos	$\alpha$ -CD8 FITC + $\alpha$ -CD14 APC	IFNR1 PE	ISO 1
9		$\alpha$ -CD8 FITC + $\alpha$ -CD14 APC	IFNR2 PE	ISO 1
10		$\alpha$ -CD8 FITC + $\alpha$ -CD14 APC	$\alpha$ -STAT 1 PE	ISO 1
11		$\alpha$ -CD8 FITC + $\alpha$ -CD14 APC	$\alpha$ -IRF 7 PE	ISO 1
12		$\alpha$ -CD8 FITC + $\alpha$ -CD14 APC	$\alpha$ -IFN- $\alpha$ PE	ISO 1

#### 4.4 Análise por qPCR (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction)

##### 4.4.1 Extração do RNA

As biópsias foram coletadas na pré e pós-terapia. O protocolo de extração do RNA foi realizado seguindo os parâmetros de extração fenol-clorofórmio através do reagente Trizol (Invitrogen). Para extrair o RNA das biópsias de colo uterino das pré-terapia e pós-terapia o tecido foi divulsionado através do uso de bisturis estéreis. Após esta etapa, foi adicionado 1mL de Trizol e a mistura foi homogeneizada, armazenada em tubos cônicos de 1,5 mL e incubadas por 5 min a 25° C, para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Foi adicionado 200  $\mu$ l de clorofórmio. Os tubos foram tampados e agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados a 25° C durante 3 minutos. As amostras foram centrifugadas à 12.000xg por 15 minutos, de 2 a 8°C. Após a centrifugação, a mistura foi separada em uma fase inferior vermelha, uma interfase e uma fase aquosa superior. Para a precipitação do RNA, transferiu-se cuidadosamente a fase aquosa para tubos cônicos de 1,5 mL limpos. Adicionou-se 500  $\mu$ l de álcool isopropílico, incubando a mistura por 10 minutos a

25° C. Centrifugou-se a 12.000xg por 10 minutos, de 2 a 8°C. O RNA precipitado forma um gel no fundo do tubo. Por fim, remove-se o sobrenadante e adiciona-se 1 mL de etanol 75%, homogeneizando bem. Centrifuga-se a 7.500xg por 5 minutos, de 2 a 8° C e remove-se o sobrenadante, restando no fundo do tubo o RNA.

#### 4.4.2 *Transcrição Reversa*

Após a extração do RNA, foi realizada a transcrição reversa, com o Kit Reverse Transcriptase (Invitrogen). Para a realização desta técnica, foi utilizado de 50ng-1µg de RNA total e adicionado os reagentes para a primeira etapa da reação de transcrição, incubando a mistura no termociclador (Veriti - 96 Well - Applied Biosystems), a 65° C por 5 minutos e 4° C por 1 minuto (Tabela 4).

**Tabela 4: Protocolo utilizado para a primeira etapa da reação de RT**

<b>Reagentes</b>	<b>Volumes (µL)</b>
<i>Primer</i> Oligo dt	0,5
Dntp	1
Água DEPC	13
RNA	10

Após este procedimento, foram adicionados aos tubos 6 µL de uma solução contendo a enzima (Superscript III rt), incubando a 25° C por 5 minutos, 50° C por 60 minutos e 70° C por 15 minutos (Tabela 5).

**Tabela 5 – Protocolo utilizado para a segunda etapa da reação de RT**

<b>Reagentes</b>	<b>Volumes (µL)</b>
Tampão Kit 5x	4
DTT	1
Enzima Superscript	1

#### 4.4.3 *Reação de PCR em tempo real*

Para a reação de PCR em tempo real foi utilizado o kit GoTaq qPCR Master Mix Promega, com volume final para a reação de 25µL, conforme as proporções da Tabela 6.

**Tabela 6 – Protocolo utilizado para a reação de qPCR**

Reagentes	Volumes ( $\mu\text{L}$ )
SYBr Green	12,5
Dye ROX	0,25
Água DEPC	
Primer F	
Primer R	Ajustável de acordo com as padronizações
Amostra	

O protocolo de temperaturas foi seguido de acordo com a bula do kit GoTaq qPCR Master Mix Promega, segundo consta na Tabela 7.

**Tabela 7 – Protocolo de temperaturas para a reação de qPCR**

	Ciclos	Programação dos ciclos
Ativação Hot-Start	1	95° C por 2 minutos
Desnaturação	40	95° por 15 segundos
Anelamento		60° por 60 segundos
Dissociação	1	60°-95°C

Os *primers* (Invitrogen) utilizados nas reações foram diluídos em tampão TE-LOW para uma concentração final de 10M e suas respectivas temperaturas de anelamento estão descritas na Tabela 8. O *primer* referente à  $\beta$ -actina foi utilizado com controle endógeno para a reação.

**Tabela 8 – Desenho dos *primers*, temperaturas de anelamento e volumes**

Primer	Sequência de nucleotídeos	Temperatura	Primer	Amostra
$\beta$ -actina Forward	5'GTGGGGCGCCCCAGGCACCA3'	60° C	2 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
$\beta$ -actina Reverse	5'CTCCTTAATGTACAGCACGATTTC3'	60° C	2 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
T-bet Forward	5'CGGCTGCATATCGTTGAGGT3'	58° C	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
T-bet Reverse	5'GTCCCCATTGGCATTTCCTC3'	58° C	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
ROR- $\gamma\text{t}$ Forward	5'GCAGCGCTCCAACATCTTCT3'	58° C	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
ROR- $\gamma\text{t}$ Reverse	5'ACGTACTGAATGGCCTCGGT3'	58° C	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
IFNR1 Forward	5'-CTTTCAAGTTCAGTGGCTCCACGC-3'	60° C	1,5 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$
IFNR1 Reverse	5'-TCACAGGCGTGTTCAGACTG-3'	60° C	1,5 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$
IFNR2 Forward	5'-GAAGGTGGTTAAGAACTGTGC-3'	60° C	1 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
IFNR2 Reverse	5'-CCCGCTGAATCCTTCTAGGACGG-3'	60° C	1 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
IFN- $\alpha$ Forward	5'- ACTTTGGATTTCCCCAGGA-3'	60° C	1 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
IFN- $\alpha$ Reverse	5'-CAGGCACAAGGGCTGTATT-3'	60° C	1 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$

A reação de qPCR foi realizada através do aparelho 7900 HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems. Os resultados da curva de dissociação, curva de amplificação e valores de Ct foram obtidos através do software SDS 2.4.1, Applied Biosystems.

#### 4.4.4 Cálculo do $\Delta\Delta Ct$

Para a normalização dos dados obtidos após os ciclos de amplificação da qPCR, foram utilizados os seguintes cálculos matemáticos, sabendo-se que o gene da  $\beta$ -actina foi utilizado como controle endógeno.

1° - Cálculo do  $\Delta Ct$  relativo à imunoterapia com Interferon- $\alpha 2b$  Peguilado:

$$\Delta Ct = Ct (\text{Gene Alvo Tratado}) - Ct (\text{Gene Controle Tratado})$$

2° - Cálculo do  $\Delta Ct$  relativo à pré-terapia com Interferon- $\alpha 2b$  Peguilado:

$$\Delta Ct = Ct (\text{Gene Alvo Controle}) - Ct (\text{Gene Controle Controle})$$

3° - Cálculo do  $\Delta\Delta Ct$ :

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Tratado}) - \Delta Ct (\text{Controle})$$

4° - Normalização do nível de expressão do gene alvo:

$$\text{Nível de Expressão} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

## 4.5 Análise Estatística dos Resultados

O banco de dados foi montado no programa Excel® versão 2013 (Microsoft Office). O software GraphPad Prism 5 foi utilizado nas análises estatísticas.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade. As variáveis categóricas foram descritas como proporção, e as variáveis contínuas por média e desvio-padrão (DP) quando a distribuição foi normal ou mediana e intervalo interquartil (IIq) quando distribuição não foi normal.

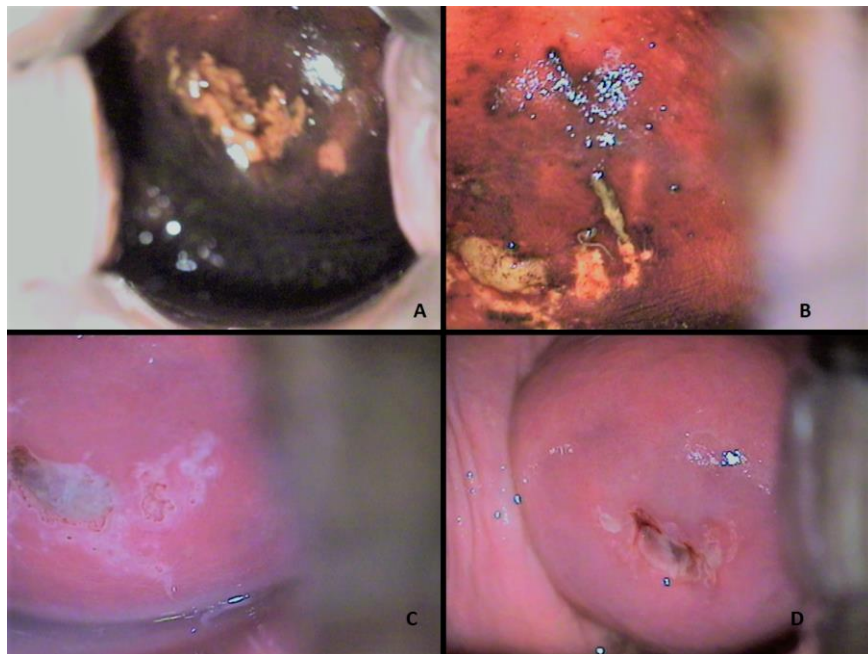
As pacientes foram divididas em dois grupos para a realização das análises: as que obtiveram regressão da lesão e as que não obtiveram regressão da lesão após o tratamento com Alfapeguinterferona 2b. Utilizou-se, a análise one-way ANOVA para avaliar todos os grupos e o teste não paramétrico de Mann-Whitney quando a variável não apresentou evidência de distribuição normal. O teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher foram usados, quando apropriados, para testar as variáveis categóricas. Para todas as análises foi considerado nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

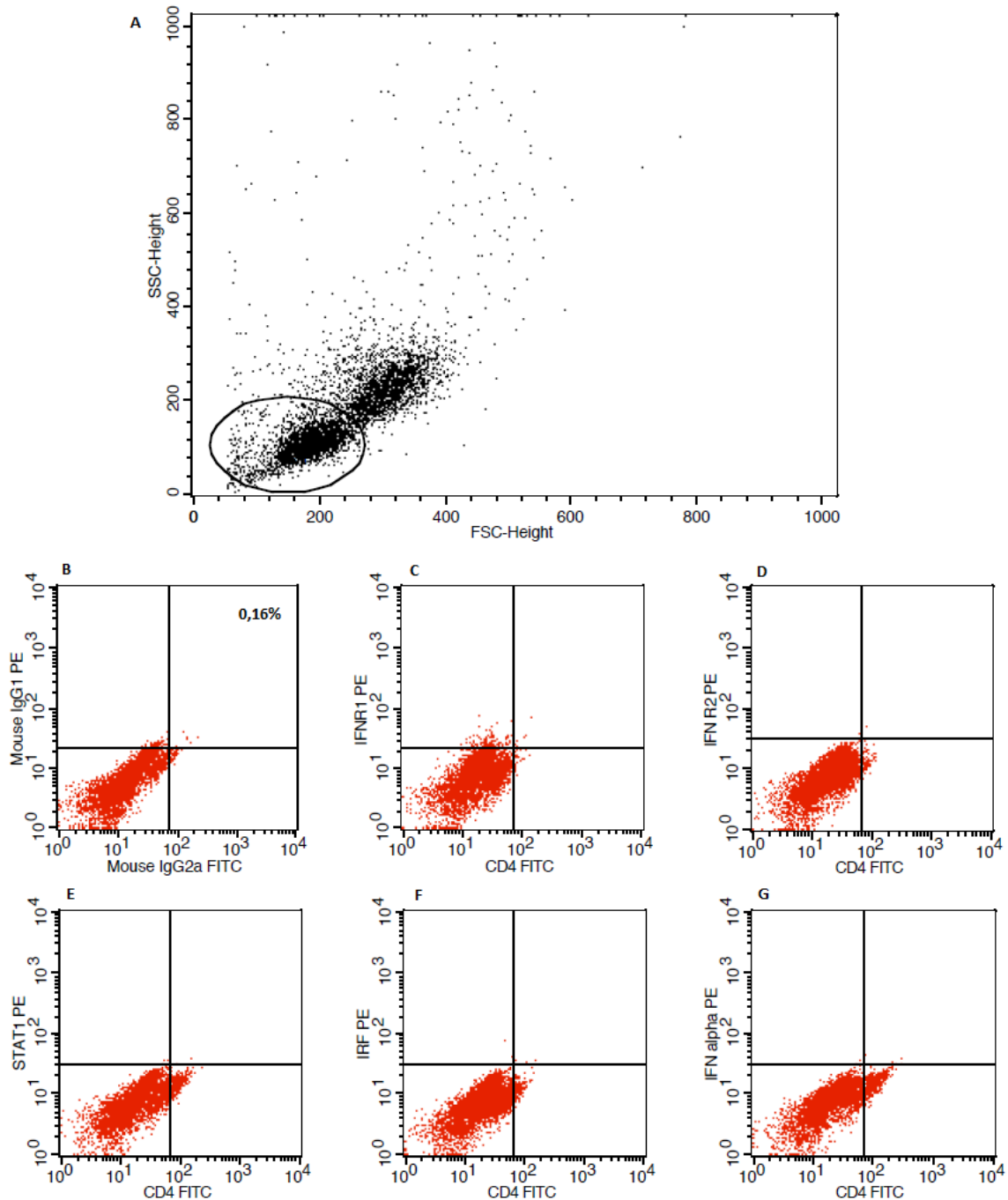
As pacientes foram acompanhadas no Ambulatório Maria da Glória no setor de Colposcopia da disciplina de Ginecologia e Obstetrícia da UFTM durante as seis semanas de aplicação do medicamento imunomodulatório Alfapeguiterferona.

As pacientes que obtiveram regressão da lesão foram encaminhadas para acompanhamento semestral no setor de colposcopia e as pacientes que não obtiveram regressão da lesão foram encaminhadas para procedimento cirúrgico de conização. Todos os diagnósticos foram realizados através do exame de colposcopia, citologia esfoliativa e confirmados através de análise histopatológica (Figura 4).

Ao longo do tratamento foi possível acompanhá-las e houve relatos de efeitos colaterais como fadiga, dispnéia, anorexia, cefaléia, mialgia, febre baixa e depressão, concentrados principalmente durante as três primeiras aplicações. Porém nenhuma paciente desistiu do tratamento.



**Figura 4:** Fotos Colposcópicas do colo uterino de paciente que apresentou regressão da lesão. Teste de Schiller (A, B) e teste do bissulfito de sódio 3% (C, D). **A, C:** pré-tratamento; **B, D:** pós-tratamento.

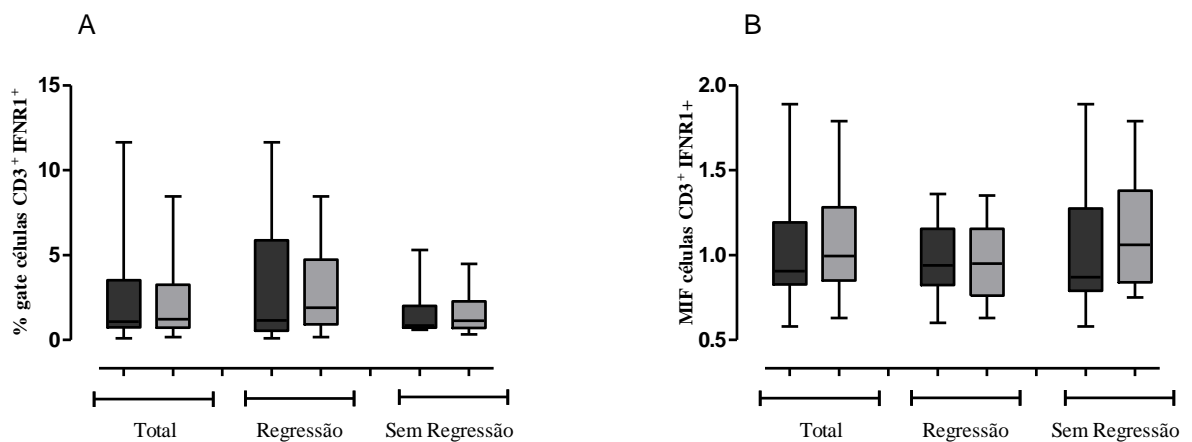


**Figura 5:** Representação da estratégia de análise por FACS e figura representativa do layout do software CellQuest (BD Biosciences). (A) A gate foi determinada através da localização que corresponde ao tamanho dos linfócitos (Forward Scatter, FSC) e à granulosidade (Side Scatter, SSC) no gráfico que representa a análise da dispersão frontal e lateral do laser. (B) Representação do quadrante acima, a direita, dos isotipos utilizados para eliminar ligações inespecíficas dos anticorpos utilizados na reação. (C-G). Gráficos representativos obtidos de uma paciente de acordo com os anticorpos utilizados, ilustrando as células duplo-positivas no quadrante acima, a direita: (C) CD4 FITC/IFNR1 PE, (D) CD4 FITC/IFNR2 PE, (E) CD4 FITC/STAT1 PE, (F) CD4 FITC/ IRF7 PE, (G) CD4 FITC/ IFN- $\alpha$  PE.

## 5.1 Análise dos Linfócitos T totais

A análise das populações de linfócitos T totais foi realizada com a marcação das moléculas de superfície CD3, comuns e específicas para todos os linfócitos. A presença de IFN- $\alpha$  e de fatores de transcrição responsivos ao IFN- $\alpha$  (STAT-1 e IRF-7) e receptores de IFN (IFNR1 e IFNR2) foi avaliada.

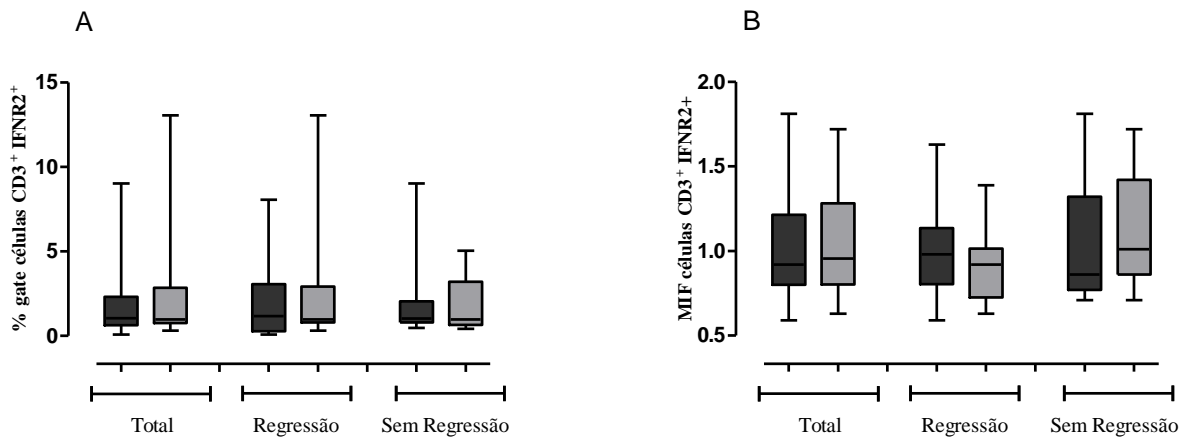
Pode-se verificar através do gráfico 1A que houve tendência à redução do número de linfócitos T CD3+ totais com IFNR1 nas pacientes que não obtiveram resposta ao tratamento, quando comparadas às pacientes que obtiveram regressão, após a 6ª aplicação (Gráfico 1A). Porém, quando analisada a concentração de IFNR1 em linfócitos TCD3+ (intensidade de fluorescência), não houve diferença significativa quando comparadas as pacientes com regressão e sem regressão (Gráfico 1B). Estes dados demonstram que, apesar de haver células TCD3+ com a presença deste receptor de Interferon no grupo que obteve a regressão da lesão, a quantidade geral do IFNR1 não se apresenta significativamente alta, quando comparados os grupos regressão e sem regressão nas duas etapas do tratamento.



**Gráfico 1:** A - Valores da porcentagem de gate dos linfócitos T positivos para IFNR1. B- Valores da média intensidade de fluorescência (MIF) do IFNR1 em linfócitos T totais. Os valores representam a análise comparativa entre as etapas do tratamento: em cinza escuro, a comparação entre a 3ª aplicação e a pré-terapia e em cinza claro, a comparação entre a 6ª aplicação e a pré-terapia. As análises foram agrupadas de acordo com a resposta ao tratamento (Regressão ou Sem Regressão) e com o número total de pacientes. Todos os valores foram expressos em mediana.

Assim como no Gráfico 1A, a análise do Gráfico 2A permite a observação da redução de linfócitos T CD3+ que possuem IFNR2 em pacientes que não obtiveram regressão da lesão, em comparação às pacientes que obtiveram regressão da lesão, após a sexta aplicação de Alfapeciterferona. A concentração de IFNR2 em linfócitos TCD3+ demonstrou alteração,

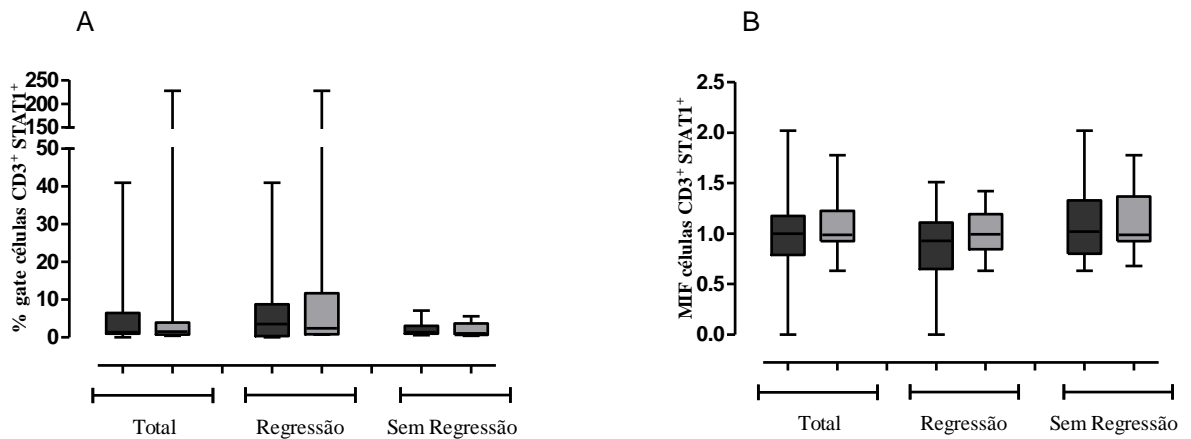
porém não significativa, quando comparadas as pacientes com regressão e sem regressão (Gráfico 2B). Estes dados demonstram que, apesar de haver células TCD3+ com a presença deste receptor de Interferon no grupo que obteve a regressão da lesão, a quantidade geral do IFNR2 não se apresenta significativamente alta, quando comparados os grupos regressão e sem regressão nas duas etapas do tratamento.



**Gráfico 2:** A - Valores da porcentagem de gate dos linfócitos T positivos para IFNR2. B- Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do IFNR2 em linfócitos T totais. Os valores representam a análise comparativa entre as etapas do tratamento: em cinza escuro, a comparação entre a 3ª aplicação e a pré-terapia e em cinza claro, a comparação entre a 6ª aplicação e a pré-terapia. As análises foram agrupadas de acordo com a resposta ao tratamento (Regressão ou Sem Regressão) e com o número total de pacientes. Todos os valores foram expressos em mediana.

Seguindo o mesmo padrão de resposta, pode-se verificar através do gráfico 3A que as pacientes que obtiveram boa resposta ao tratamento mostraram tendência ao aumento do número de linfócitos T CD3+ marcados com STAT-1, quando comparadas às pacientes que obtiveram má resposta ao tratamento. Este aumento significativo não foi acompanhado pelo aumento da concentração de STAT-1 em linfócitos TCD3+ (Gráfico 3B). Desta forma, apesar de haver células TCD3+ com a presença deste fator de transcrição no grupo que obteve a regressão da lesão, a quantidade geral de STAT-1 não se apresenta significativamente alta, quando comparados os grupos regressão e sem regressão nas duas etapas do tratamento.

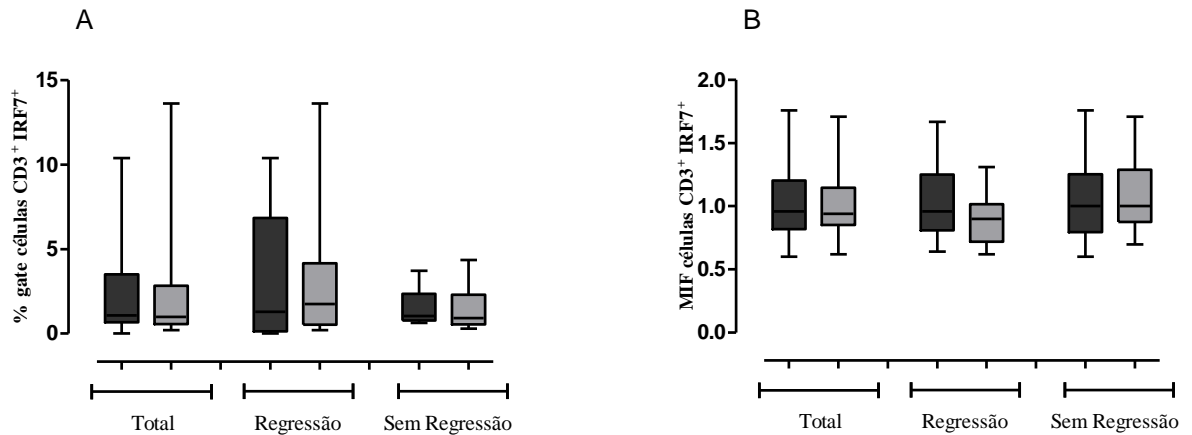




**Gráfico 3:** A - Valores da porcentagem de gate dos linfócitos T positivos para STAT-1. B- Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do STAT-1 em linfócitos T totais. Os valores representam a análise comparativa entre as etapas do tratamento: em cinza escuro, a comparação entre a 3ª aplicação e a pré-terapia e em cinza claro, a comparação entre a 6ª aplicação e a pré-terapia. As análises foram agrupadas de acordo com a resposta ao tratamento (Regressão ou Sem Regressão) e com o número total de pacientes. Todos os valores foram expressos em mediana.

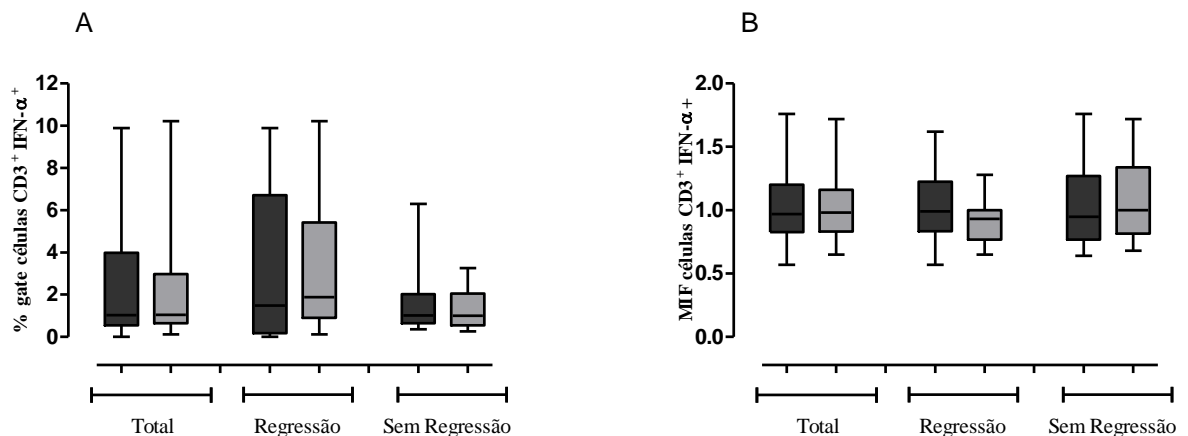
Ao analisar o Gráfico 4A, observa-se tendência à redução de linfócitos T CD3<sup>+</sup> com IRF-7 em pacientes que não obtiveram regressão da lesão, em comparação às pacientes que obtiveram regressão da lesão, principalmente após a sexta aplicação de Alfapéginterferona. Porém, a concentração de IRF-7 em linfócitos TCD3<sup>+</sup> não mostrou alteração, quando comparadas as pacientes com regressão e sem regressão (Gráfico 4B). Assim, apesar de haver células TCD3<sup>+</sup> com a presença deste fator de transcrição no grupo que obteve a regressão da lesão, a concentração geral de IRF-7 (intensidade de fluorescência) não se apresenta significativamente alta, quando comparados os grupos regressão e sem regressão nas duas etapas do tratamento.

O gráfico 5A demonstra que as pacientes que obtiveram boa resposta ao tratamento mostraram tendência ao aumento do número de linfócitos T CD3<sup>+</sup> marcados com IFN- $\alpha$ , principalmente após a 6ª aplicação, quando comparadas às pacientes que obtiveram má resposta ao tratamento. Esta tendência não foi acompanhada pelo aumento da concentração de IFN- $\alpha$  em linfócitos TCD3<sup>+</sup> (Gráfico 5B). Assim, apesar de haver células TCD3<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\alpha$  no grupo que obteve a regressão da lesão, a concentração geral de IFN- $\alpha$  (intensidade de fluorescência) não se apresenta significativamente alta, quando comparados os grupos regressão e sem regressão nas duas etapas do tratamento.



**Gráfico 4:** A - Valores da porcentagem de gate dos linfócitos T positivos para IRF-7. B- Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do IRF-7 em linfócitos T totais. Os valores representam a análise comparativa entre as etapas do tratamento: em cinza escuro, a comparação entre a 3ª aplicação e a pré-terapia e em cinza claro, a comparação entre a 6ª aplicação e a pré-terapia. As análises foram agrupadas de acordo com a resposta ao tratamento (Regressão ou Sem Regressão) e com o número total de pacientes. Todos os valores foram expressos em mediana.

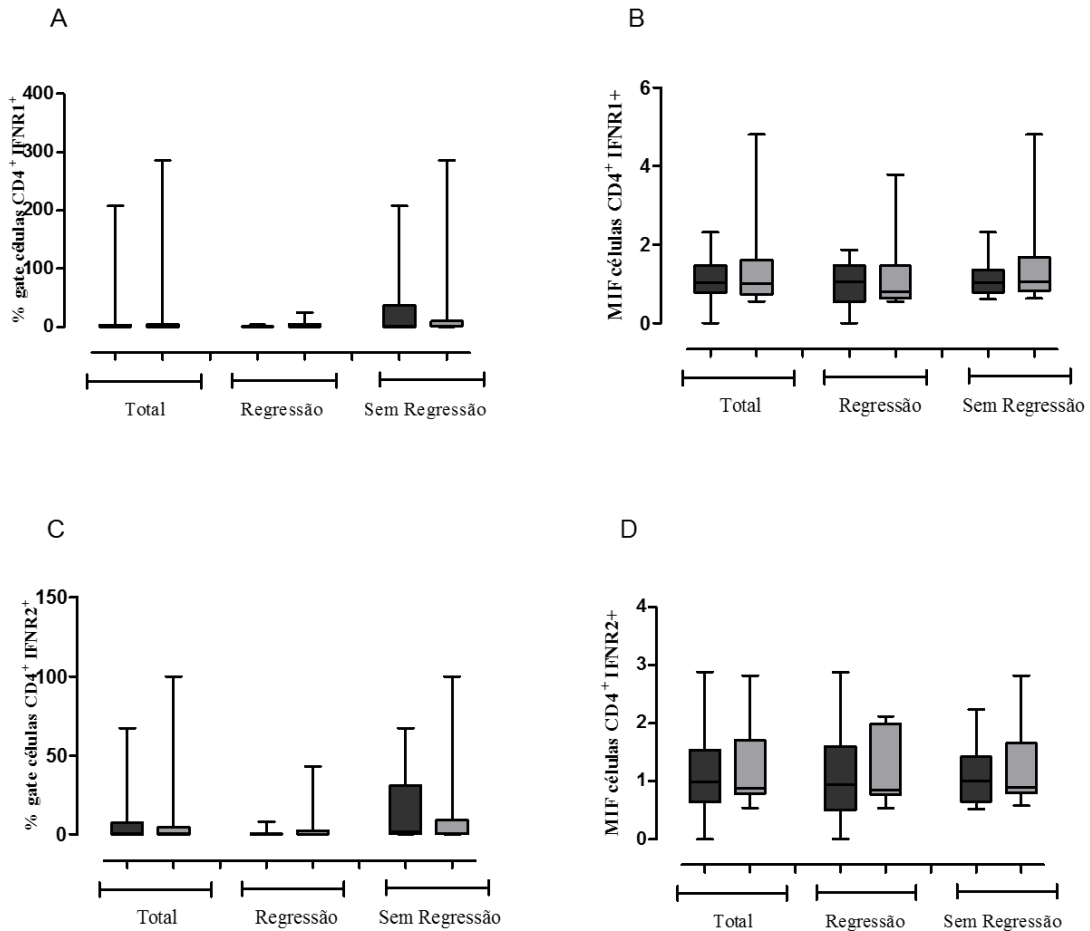
A análise de linfócitos T CD3+ totais demonstra um comportamento similar entre as pacientes que obtiveram a regressão da lesão após a 6ª aplicação de Alfaferon, havendo uma tendência ao aumento da ativação das vias indutoras de IFN- $\alpha$ . Da mesma forma, as pacientes que não obtiveram regressão da lesão mostraram uma tendência à diminuição, tanto dos receptores e fatores de transcrição quanto da produção de IFN- $\alpha$ .



**Gráfico 5:** A - Valores da porcentagem de gate dos linfócitos T positivos para IFN- $\alpha$ . B- Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do IFN- $\alpha$  em linfócitos T totais. Os valores representam a análise comparativa entre as etapas do tratamento: em cinza escuro, a comparação entre a 3ª aplicação e a pré-terapia e em cinza claro, a comparação entre a 6ª aplicação e a pré-terapia. As análises foram agrupadas de acordo com a resposta ao tratamento (Regressão ou Sem Regressão) e com o número total de pacientes. Todos os valores foram expressos em mediana.

## 5.2 Análise dos Linfócitos T Auxiliares

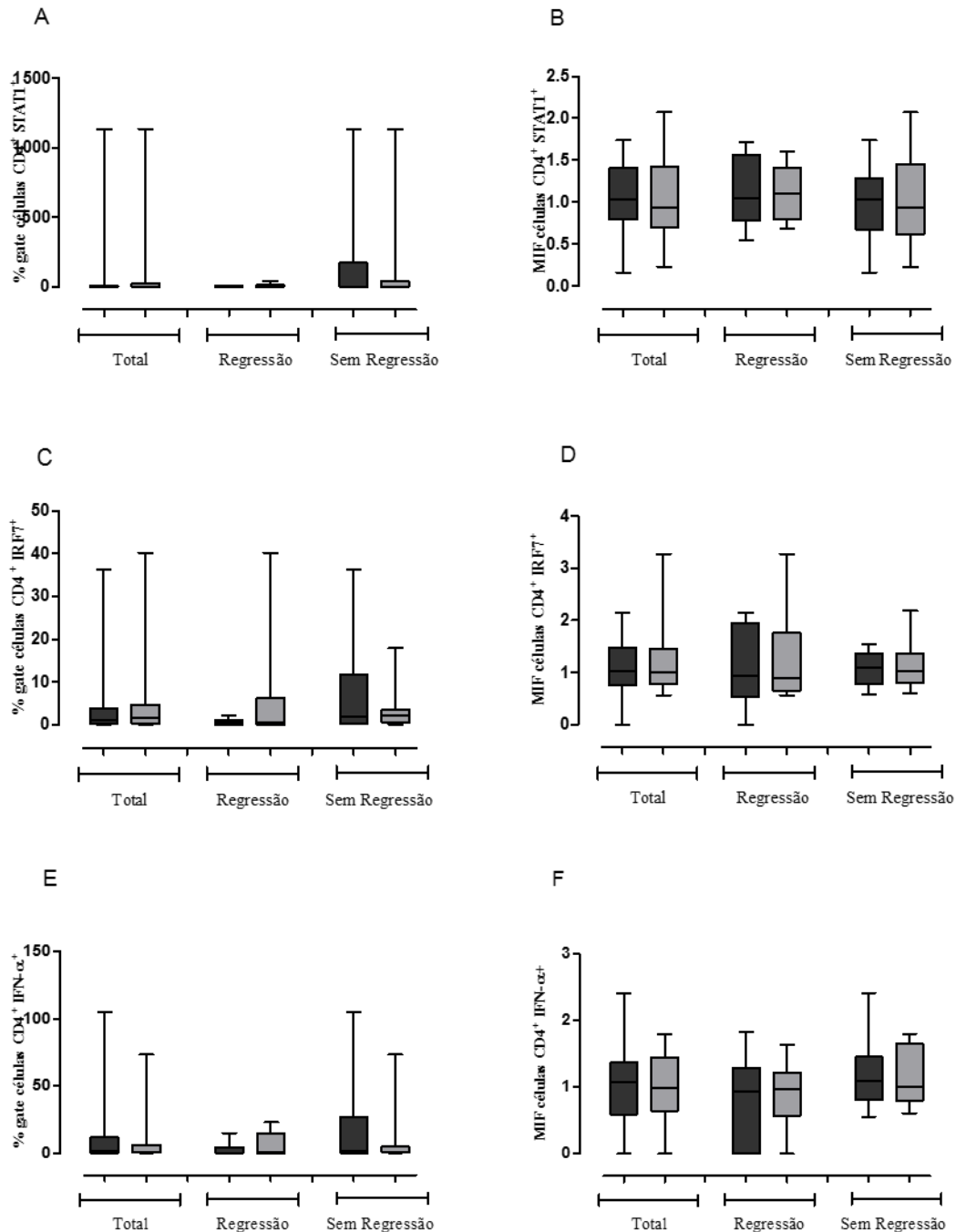
A análise das populações de linfócitos T Auxiliares foi realizada com a marcação das moléculas de superfície CD4, comuns e específicas para estes linfócitos. A presença de IFN- $\alpha$  e de fatores de transcrição responsivos ao IFN- $\alpha$  (STAT-1 e IRF-7) e receptores de IFN (IFNR1 e IFNR2) foi avaliada.



**Gráfico 6:** A/C- Valores da porcentagem de gate dos linfócitos T auxiliares positivos para IFNR1 e IFNR2, respectivamente. B/D- Valores da intensidade de fluorescência (MIF) de IFNR1 e IFNR2, respectivamente, em linfócitos T auxiliares. Os valores representam a análise comparativa entre as etapas do tratamento: em cinza escuro, a comparação entre a 3ª aplicação e a pré-terapia e em cinza claro, a comparação entre a 6ª aplicação e a pré-terapia. As análises foram agrupadas de acordo com a resposta ao tratamento (Regressão ou Sem Regressão) e com o número total de pacientes. Todos os valores foram expressos em mediana.

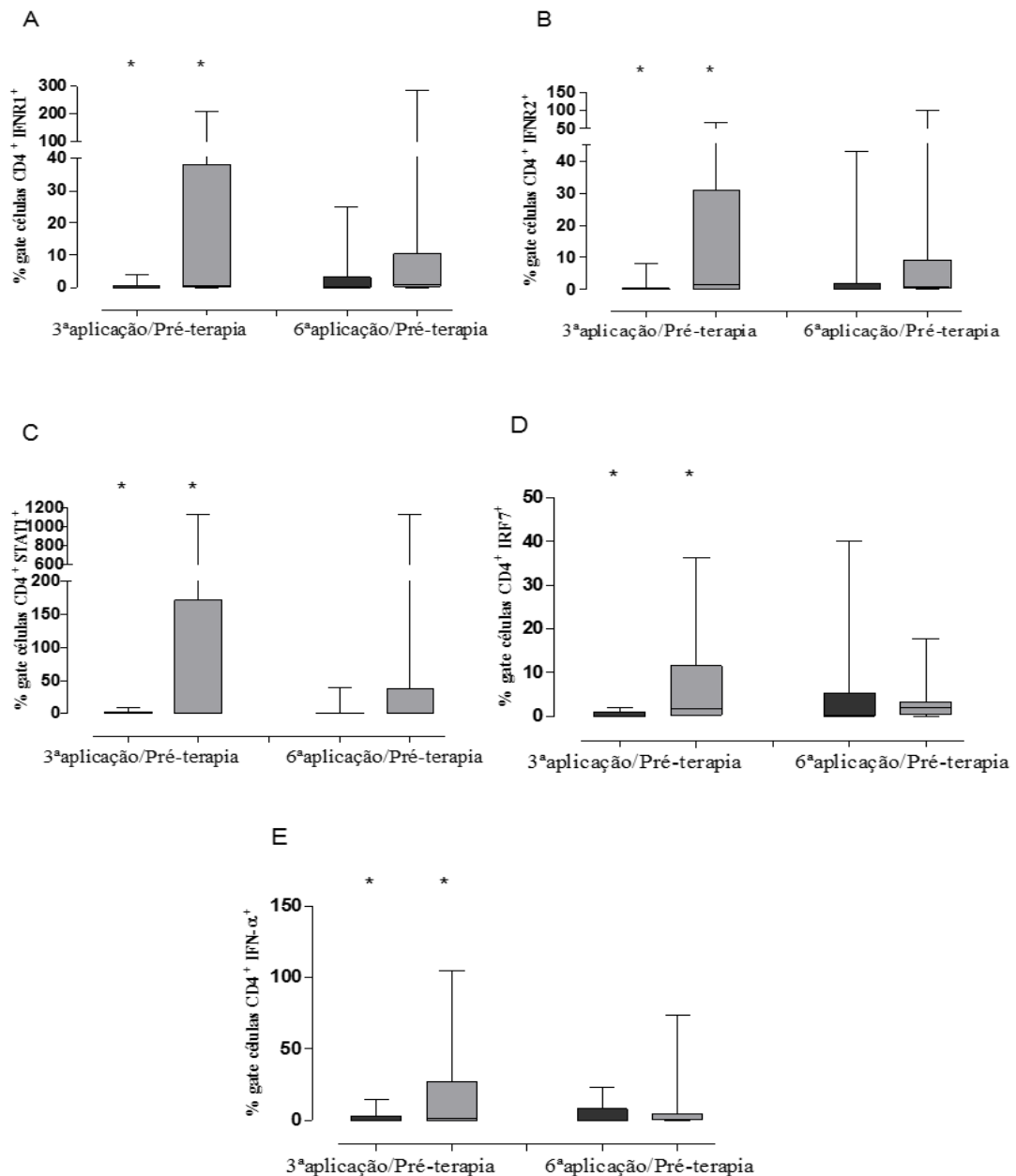
O Gráfico 6 demonstra que a presença de IFNR1 e IFNR2 em linfócitos T auxiliares não variou, tanto no número de células marcadas, quanto na quantidade de IFNR2 presente nestas células, entre pacientes que obtiveram regressão da lesão e que não obtiveram a

regressão da lesão. Da mesma forma, o Gráfico 7 mostra que não há variações na produção de STAT1, IRF7 e IFN- $\alpha$  quando comparadas todas as pacientes do estudo.



**Gráfico 7:** A/C/E - Valores da porcentagem de gate dos linfócitos T auxiliares positivos para STAT1, IRF7 e IFN- $\alpha$ , respectivamente. B/C/F- Valores da intensidade de fluorescência (MIF) de STAT1, IRF7 e IFN- $\alpha$ , respectivamente, em linfócitos T auxiliares. Os valores representam a análise comparativa entre as etapas do tratamento: em cinza escuro, a comparação entre a 3ª aplicação e a pré-terapia e em cinza claro, a comparação entre a 6ª aplicação e a pré-terapia. As análises foram agrupadas de acordo com a resposta ao tratamento (Regressão ou Sem Regressão) e com o número total de pacientes. Todos os valores foram expressos em mediana.

Quando comparadas as etapas do tratamento com a regressão da lesão observa-se significativo aumento tanto de IFNR1 ( $p=0,0336$ ) quanto de IFNR2 ( $p=0,0165$ ) em pacientes que não obtiveram a regressão da lesão durante a terceira aplicação, decaindo durante a 6ª aplicação. Da mesma forma, os fatores STAT1, IRF7 e IFN- $\alpha$  aumentaram durante a 3ª aplicação e decaíram na 6ª aplicação em pacientes que não obtiveram regressão da lesão.

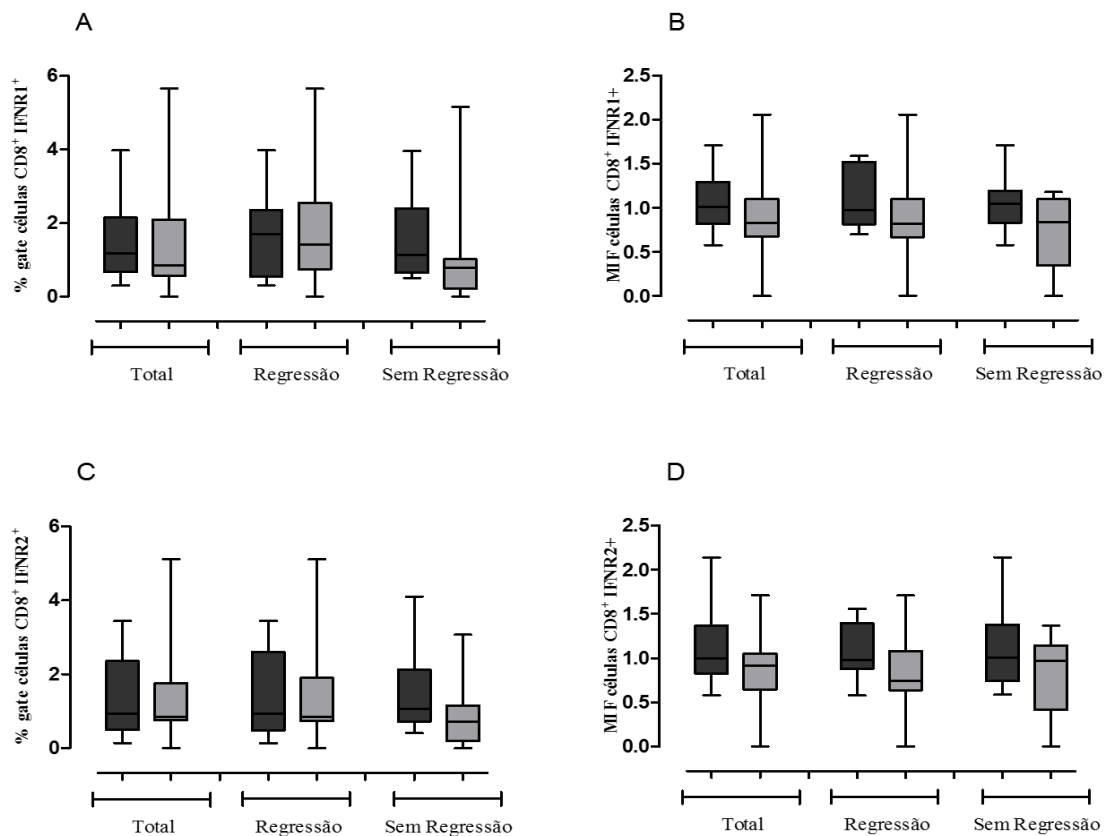


**Gráfico 8:** Valores da porcentagem de gate dos linfócitos T auxiliares positivos para **A** – IFNR1, **B** – IFNR2, **C** – STAT1, **D** – IRF7, **E** – IFN- $\alpha$ . Os valores representam a análise comparativa entre as etapas do tratamento: 3ª aplicação e a pré-terapia; 6ª aplicação e a pré-terapia. As análises foram agrupadas de acordo com a resposta ao tratamento: cinza escuro representa regressão da lesão e cinza claro, sem regressão. Todos os valores foram expressos em mediana. \*Valores de  $p < 0,05$ .

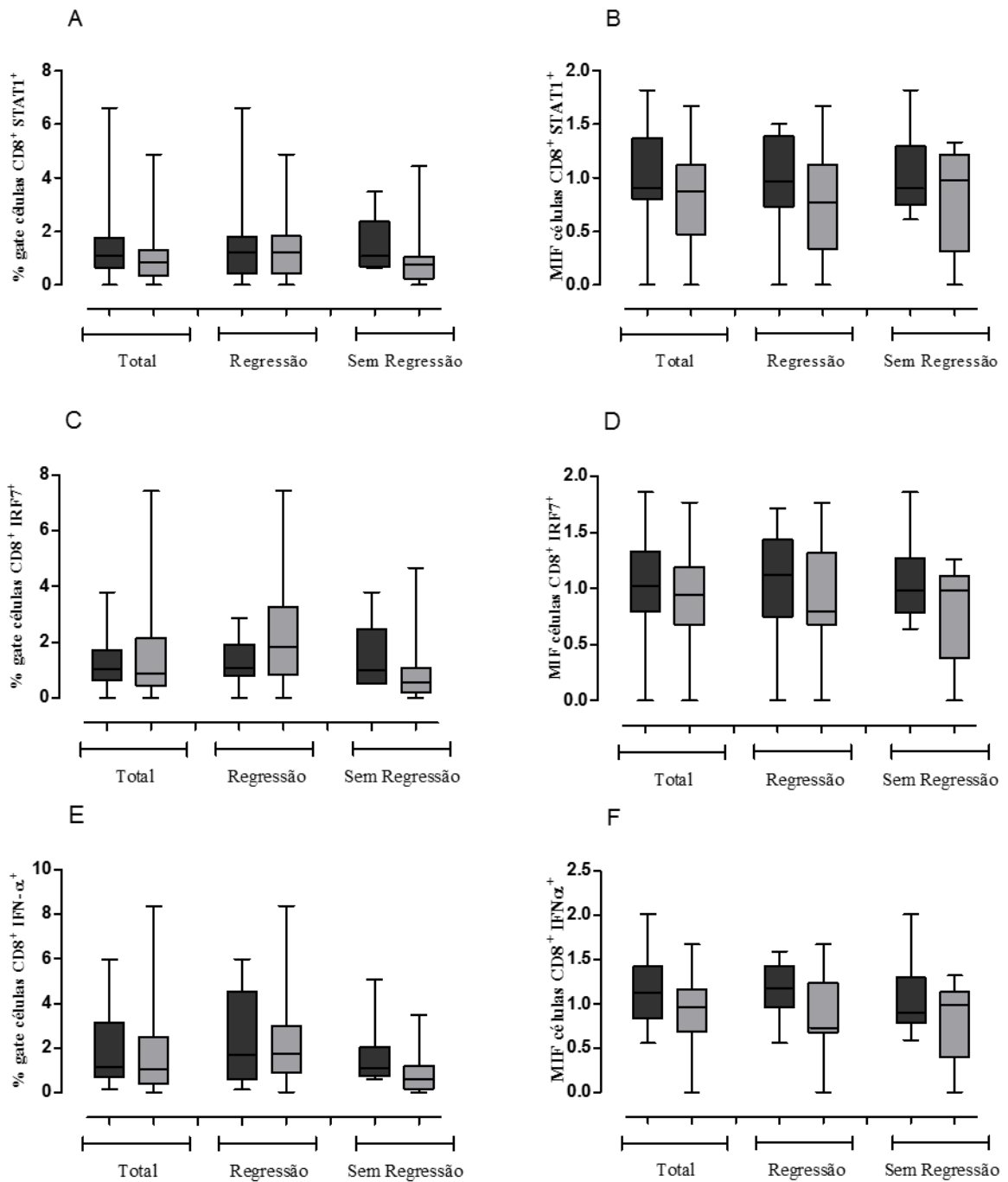
### 5.3 Análise dos Linfócitos T Citotóxicos

A análise das populações de linfócitos T Citotóxicos foi realizada com a marcação das moléculas de superfície CD8, comuns e específicas para estes linfócitos. A presença de IFN- $\alpha$  e de fatores de transcrição responsivos ao IFN- $\alpha$  (STAT-1 e IRF-7) e receptores de IFN (IFNR1 e IFNR2) foi avaliada.

O Gráfico 9 demonstra que a presença de IFNR1 e IFNR2 em linfócitos TCD8+ não variou, tanto no número de células marcadas, quanto na quantidade destes receptores presente nestas células, entre pacientes que obtiveram regressão da lesão e que não obtiveram a regressão da lesão. Da mesma forma, o Gráfico 10 mostra que não há variações na produção de STAT1, IRF7 e IFN- $\alpha$  quando comparadas todas as pacientes do estudo.

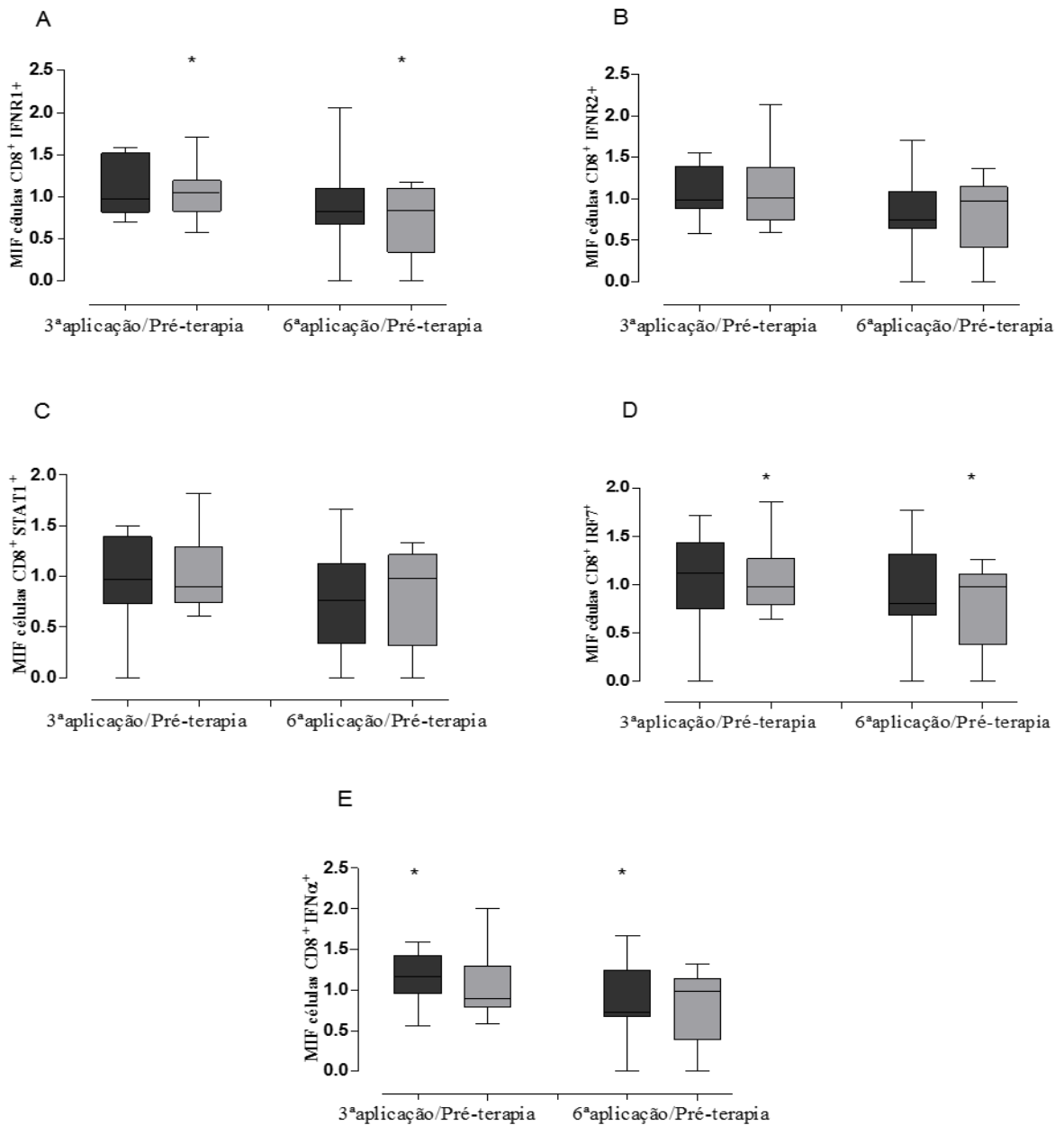


**Gráfico 09:** A/C - Valores da porcentagem de gate dos linfócitos T citotóxicos positivos para IFNR1, IFNR2, respectivamente. B/D- Valores da intensidade de fluorescência (MIF) de IFNR1 e IFNR2, respectivamente, em linfócitos T citotóxicos. Os valores representam a análise comparativa entre as etapas do tratamento: em cinza escuro, a comparação entre a 3ª aplicação e a pré-terapia e em cinza claro, a comparação entre a 6ª aplicação e a pré-terapia. As análises foram agrupadas de acordo com a resposta ao tratamento (Regressão ou Sem Regressão) e com o número total de pacientes. Todos os valores foram expressos em mediana.



**Gráfico 10:** A/C/E - Valores da porcentagem de gate dos linfócitos T citotóxicos positivos para STAT1, IRF7 e IFN- $\alpha$ , respectivamente. B/D/F- Valores da intensidade de fluorescência (MIF) de STAT1, IRF7 e IFN- $\alpha$ , respectivamente, em linfócitos T citotóxicos. Os valores representam a análise comparativa entre as etapas do tratamento: em cinza escuro, a comparação entre a 3ª aplicação e a pré-terapia e em cinza claro, a comparação entre a 6ª aplicação e a pré-terapia. As análises foram agrupadas de acordo com a resposta ao tratamento (Regressão ou Sem Regressão) e com o número total de pacientes. Todos os valores foram expressos em mediana.

Quando comparadas as etapas do tratamento com a regressão da lesão (Gráfico 11) observa-se significativa redução de IFNR1 ( $p=0,0391$ ) e IRF7 ( $p=0,05$ ) em pacientes que não obtiveram a regressão da lesão quando comparada a terceira aplicação com a 6ª aplicação. Nas pacientes que obtiveram regressão da lesão houve uma queda da intensidade de fluorescência de IFN- $\alpha$  na 6ª aplicação ( $p=0,05$ ).



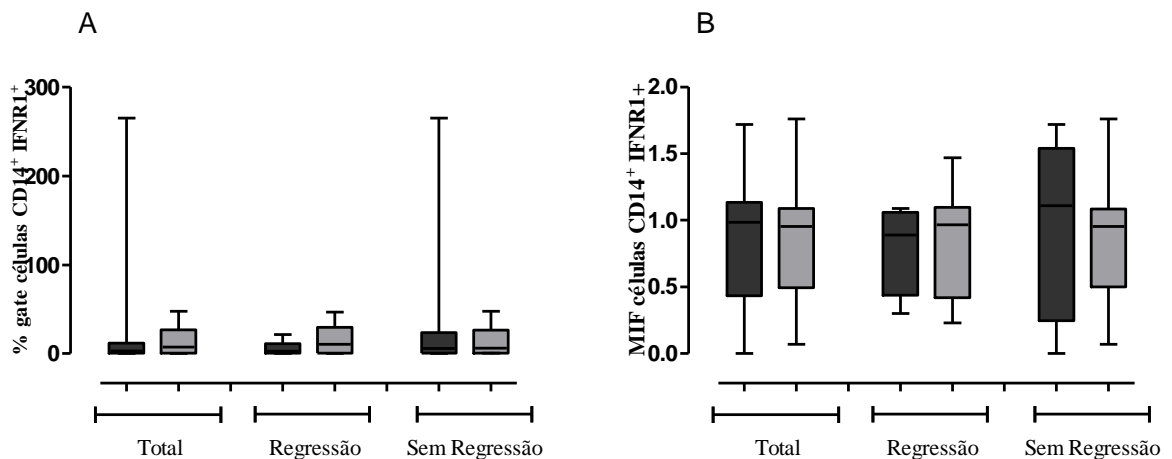
**Gráfico 11:** Valores da intensidade de fluorescência (MIF) dos linfócitos T citotóxicos positivos para **A** – IFNR1, **B** – IFNR2, **C** - STAT1, **D** – IRF7, **E** – IFN- $\alpha$ . Os valores representam a análise comparativa entre as etapas do tratamento: 3ª aplicação e a pré-terapia; 6ª aplicação e a pré-terapia. As análises foram agrupadas de acordo com a resposta ao tratamento: cinza escuro representa regressão da lesão e cinza claro, sem regressão. Todos os valores foram expressos em mediana. \*Valores de  $p < 0,05$ .



## 5.4 Análise dos Monócitos

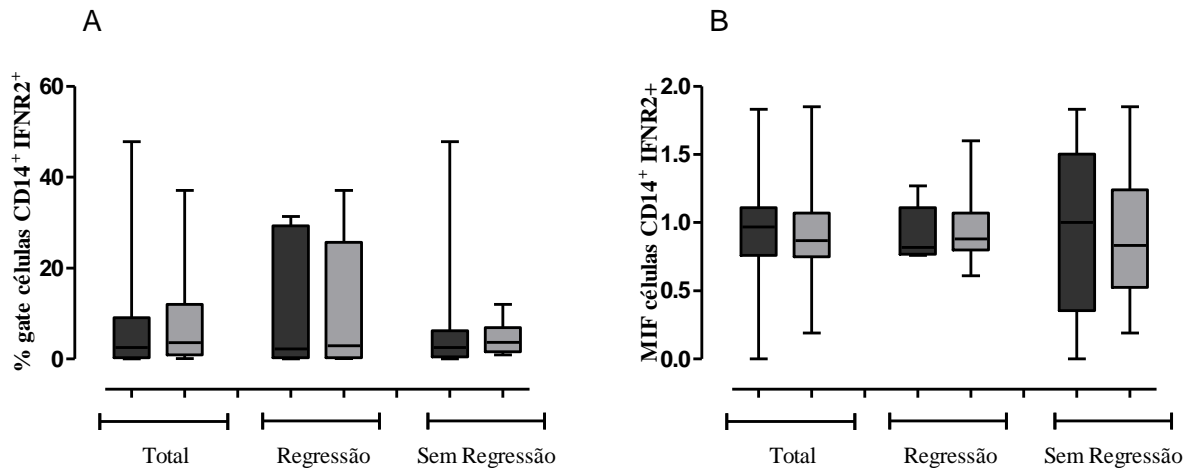
A análise das populações de Monócitos foi realizada com a marcação das moléculas de superfície CD14, comuns e específicas para estas células. A presença de IFN- $\alpha$  e de fatores de transcrição responsivos ao IFN- $\alpha$  (STAT-1 e IRF-7) e receptores de IFN (IFNR1 e IFNR2) foi avaliada.

Os Gráficos 12 A e 12 B demonstram que a presença de IFNR1 em monócitos não variou, tanto no número de células marcadas, quanto na quantidade de IFNR1 presente nestas células, entre pacientes que obtiveram regressão da lesão e que não obtiveram a regressão da lesão.



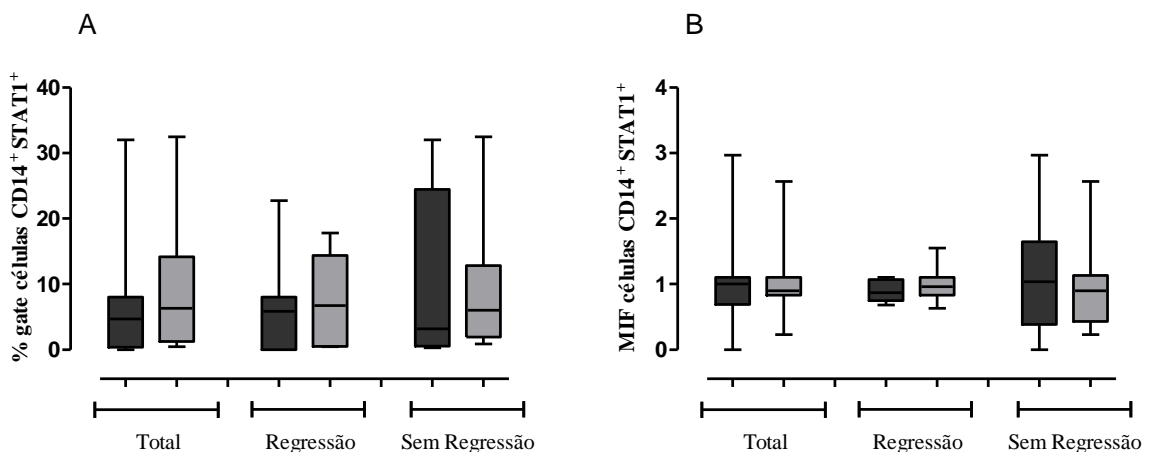
**Gráfico 12:** A - Valores da porcentagem de gate dos monócitos positivos para IFNR1. B- Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do IFNR1 em monócitos. Os valores representam a análise comparativa entre as etapas do tratamento: em cinza escuro, a comparação entre a 3ª aplicação e a pré-terapia e em cinza claro, a comparação entre a 6ª aplicação e a pré-terapia. As análises foram agrupadas de acordo com a resposta ao tratamento (Regressão ou Sem Regressão) e com o número total de pacientes. Todos os valores foram expressos em mediana.

Os Gráficos 13 A e 13 B demonstram que a presença de IFNR2 em monócitos não variou, tanto no número de células marcadas, quanto na quantidade de IFNR2 presente nestas células, entre pacientes que obtiveram regressão da lesão e que não obtiveram a regressão da lesão.

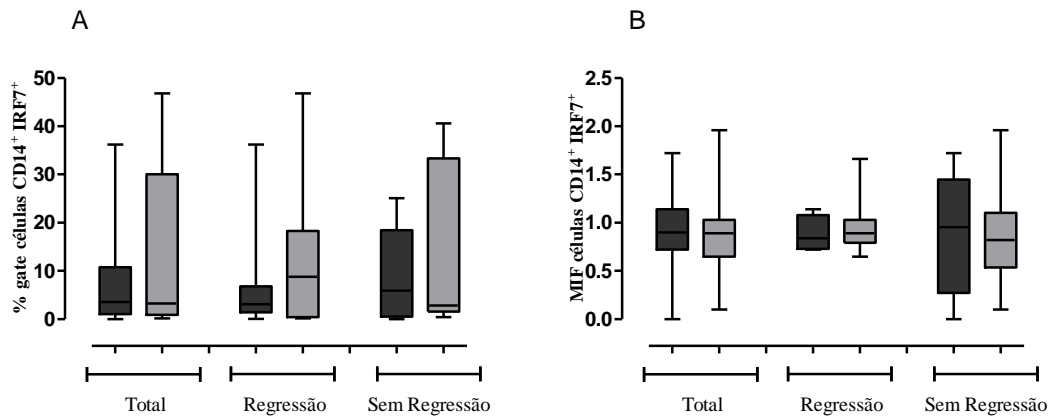


**Gráfico 13:** A - Valores da porcentagem de gate dos monócitos positivos para IFN2. B- Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do IFN2 em monócitos. Os valores representam a análise comparativa entre as etapas do tratamento: em cinza escuro, a comparação entre a 3ª aplicação e a pré-terapia e em cinza claro, a comparação entre a 6ª aplicação e a pré-terapia. As análises foram agrupadas de acordo com a resposta ao tratamento (Regressão ou Sem Regressão) e com o número total de pacientes. Todos os valores foram expressos em mediana.

Os Gráficos 14 e 15 demonstram que a presença de STAT1 e IRF7 em monócitos não variou, tanto no número de células marcadas, quanto na quantidade destes fatores presente nestas células, entre pacientes que obtiveram regressão da lesão e que não obtiveram a regressão da lesão.

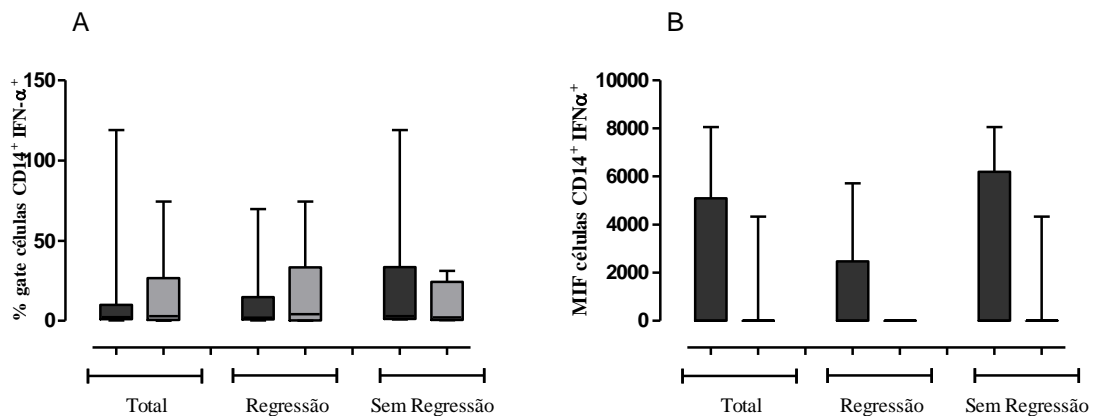


**Gráfico 14:** A - Valores da porcentagem de gate dos monócitos positivos para STAT1. B- Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do STAT1 em monócitos. Os valores representam a análise comparativa entre as etapas do tratamento: em cinza escuro, a comparação entre a 3ª aplicação e a pré-terapia e em cinza claro, a comparação entre a 6ª aplicação e a pré-terapia. As análises foram agrupadas de acordo com a resposta ao tratamento (Regressão ou Sem Regressão) e com o número total de pacientes. Todos os valores foram expressos em mediana.



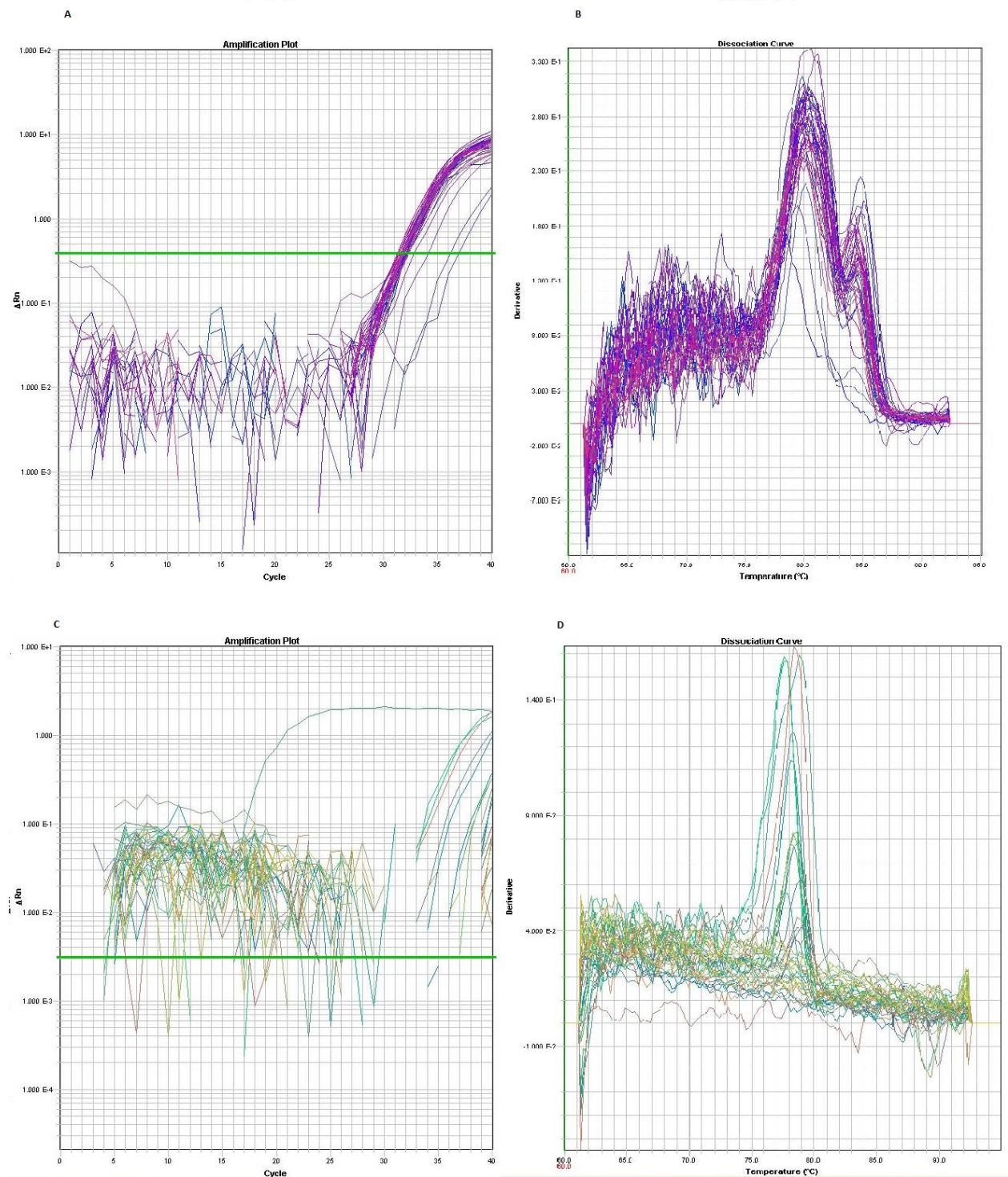
**Gráfico 15:** A - Valores da porcentagem de gate dos monócitos positivos para IRF7. B- Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do IRF7 em monócitos. Os valores representam a análise comparativa entre as etapas do tratamento: em cinza escuro, a comparação entre a 3ª aplicação e a pré-terapia e em cinza claro, a comparação entre a 6ª aplicação e a pré-terapia. As análises foram agrupadas de acordo com a resposta ao tratamento (Regressão ou Sem Regressão) e com o número total de pacientes. Todos os valores foram expressos em mediana.

Ao analisar os dados do Gráfico 16, observa-se tendência ao aumento de monócitos com IFN- $\alpha$  em pacientes que não obtiveram regressão da lesão, em comparação às pacientes que obtiveram regressão da lesão, após a terceira aplicação, o qual não houve a manutenção deste aumento após a sexta aplicação.

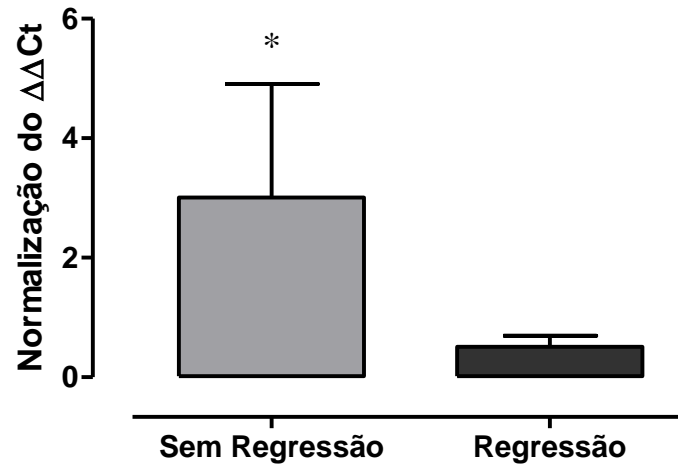


**Gráfico 16:** A - Valores da porcentagem de gate dos monócitos positivos para IFN- $\alpha$ . B- Valores da intensidade de fluorescência (MIF) do IFN- $\alpha$  em monócitos. Os valores representam a análise comparativa entre as etapas do tratamento: em cinza escuro, a comparação entre a 3ª aplicação e a pré-terapia e em cinza claro, a comparação entre a 6ª aplicação e a pré-terapia. As análises foram agrupadas de acordo com a resposta ao tratamento (Regressão ou Sem Regressão) e com o número total de pacientes. Todos os valores foram expressos em mediana. \* 3ª aplicação/Pré-terapia Regressão X 3ª aplicação/Pré-terapia Sem Regressão (p=0,0417).

## 5.5 Análise do gene ROR $\gamma$ t



**Figura 6:** Representação gráfica da curva de amplificação (A e C) e da curva de dissociação (B e D) através do software SDS Real Time. **A, B** – Representação gráfica da amplificação e dissociação do gene endógeno  $\beta$ -actina. **C, D** – Representação gráfica da amplificação e dissociação do gene pesquisado ROR $\gamma$ t.



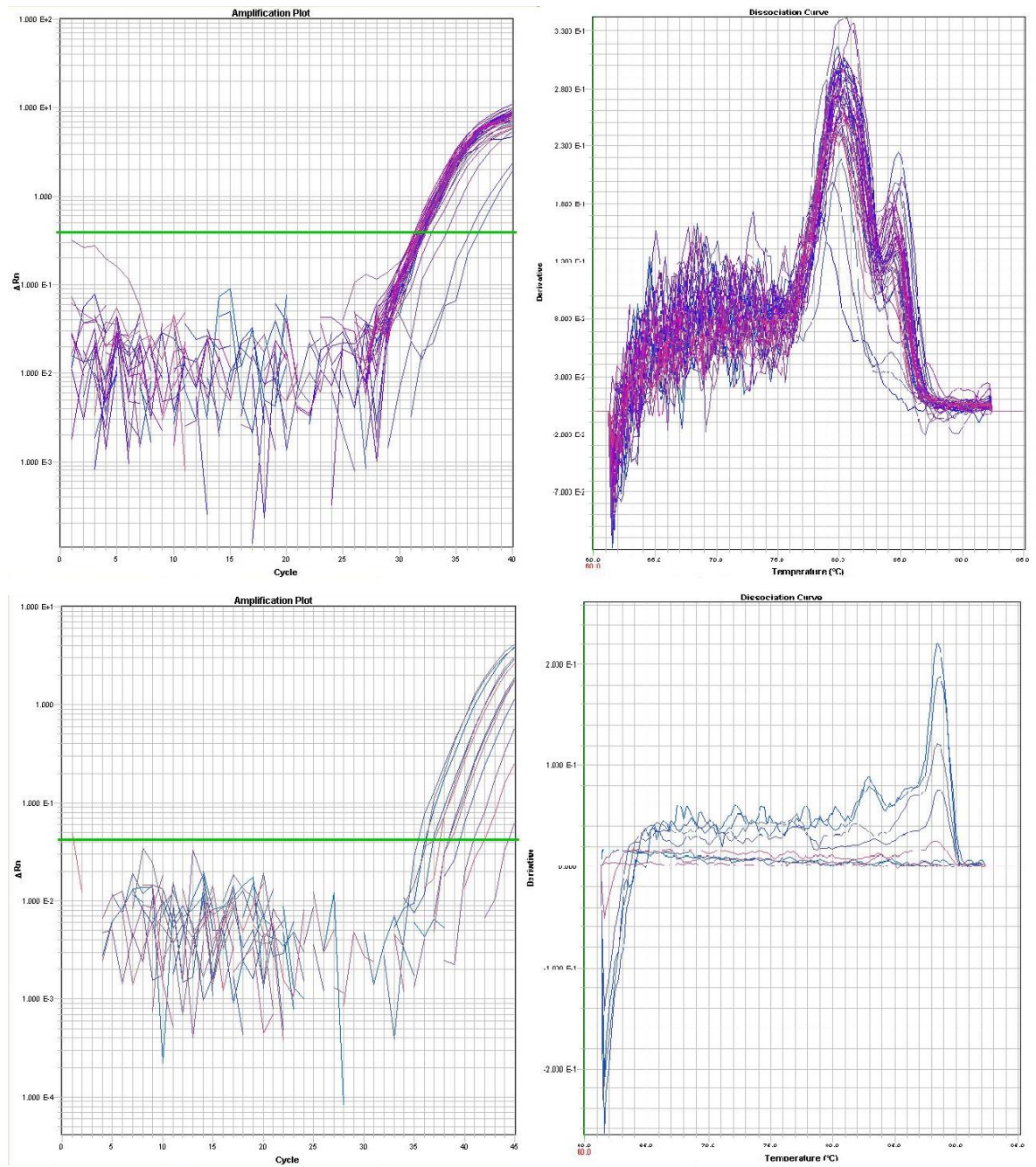
**Gráfico 17:** Valores da normalização matemática do  $\Delta\Delta Ct$ , que representa o número de vezes que o gene  $ROR\gamma t$  foi expresso. Em cinza claro, as pacientes que não obtiveram a regressão da lesão estão representadas com o aumento significativo da expressão do gene  $ROR\gamma t$  ( $p=0,0380$ ), quando comparadas às pacientes que obtiveram regressão da lesão.

A análise da expressão do fator de transcrição  $ROR\gamma t$  demonstra que as pacientes que não obtiveram a regressão da lesão apresentaram uma expressão deste fator significativamente mais elevada ( $p = 0,0236$ ) do que as pacientes com regressão.

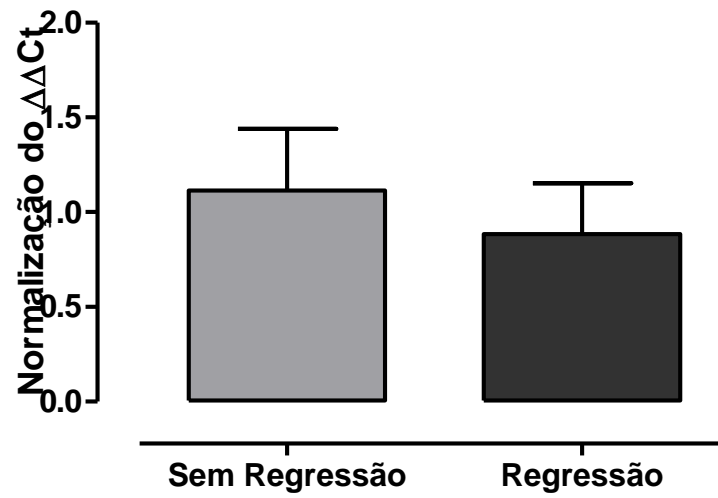
Este resultado descrito acima pode indicar o papel dos linfócitos Th17 na resposta ao tratamento: é possível que pacientes que desenvolvem a ativação de células Th17 não respondam ao tratamento com Alfapecuinterferona.



## 5.6 Análise do gene T-bet



**Figura 7:** Representação gráfica da curva de amplificação (A e C) e da curva de dissociação (B e D) através do software SDS Real Time. **A, B** – Representação gráfica da amplificação e dissociação do gene endógeno  $\beta$ -actina. **C, D** – Representação gráfica da amplificação e dissociação do gene pesquisado T-bet.

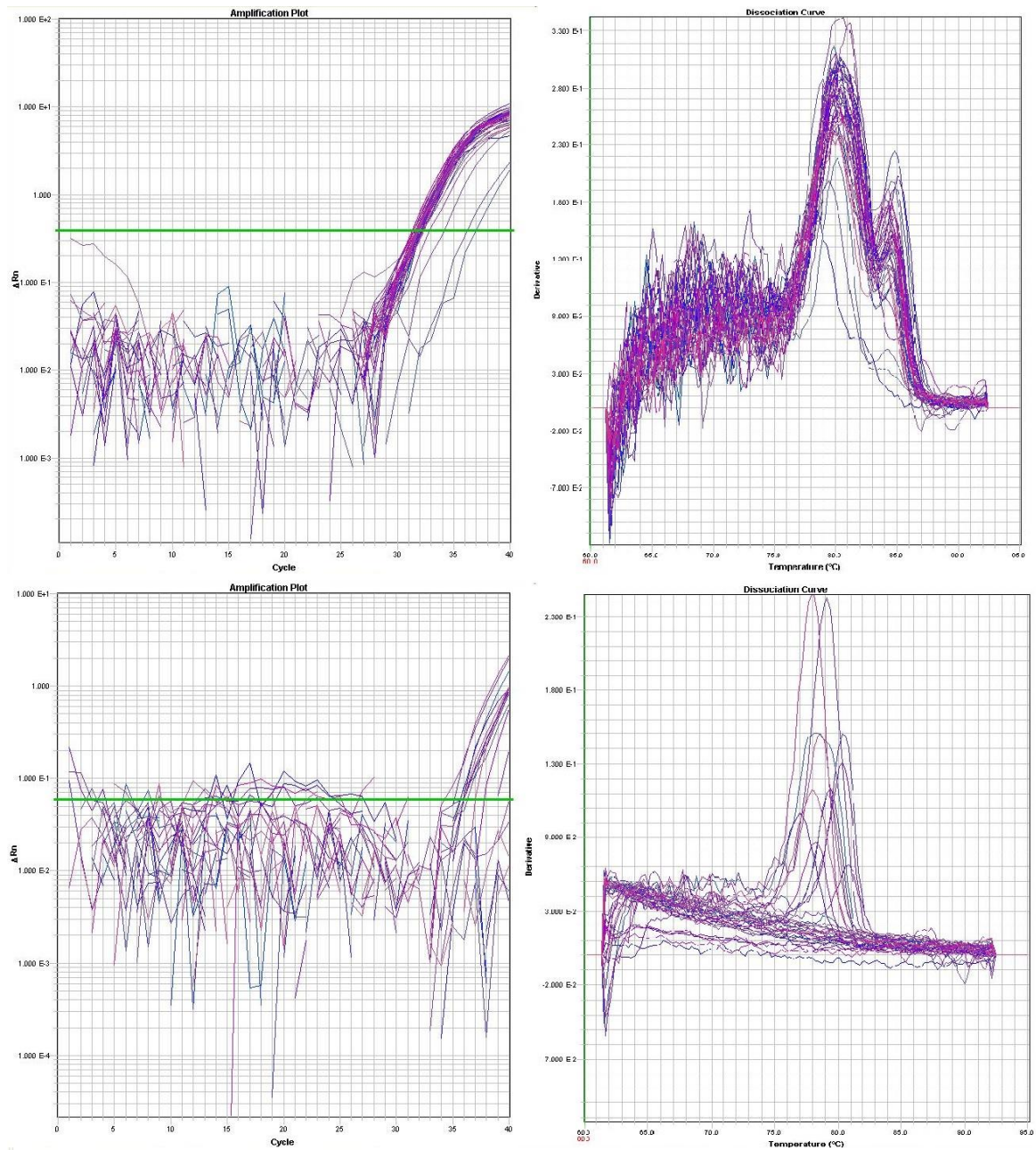


**Gráfico 18:** Valores da normalização matemática do  $\Delta\Delta C_t$ , que representa o número de vezes que o gene T-bet foi expresso. Em cinza claro, as pacientes que não obtiveram a regressão da lesão e em cinza escuro, pacientes com regressão da lesão.

A expressão do fator de transcrição Tbet demonstra que todas as pacientes do estudo apresentaram equilíbrio na expressão deste fator, importante para o desenvolvimento de resposta Th1.

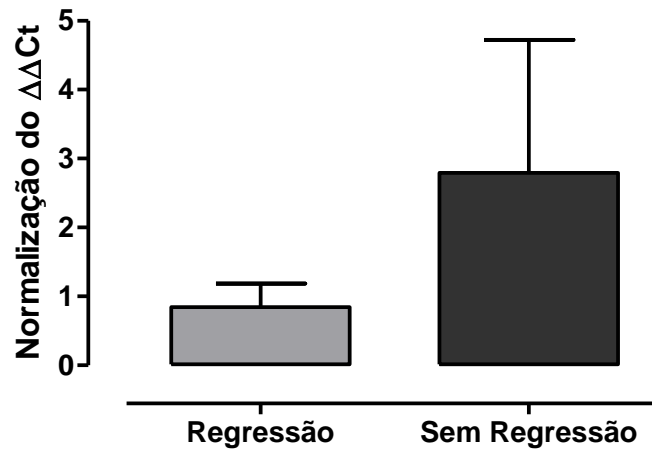
Este resultado demonstra o importante papel da homeostase na resposta imunológica.

## 5.7 Análise do gene IFNR1



**Figura 8:** Representação gráfica da curva de amplificação (A e C) e da curva de dissociação (B e D) através do software SDS Real Time. **A, B** – Representação gráfica da amplificação e dissociação do gene endógeno  $\beta$ -actina. **C, D** – Representação gráfica da amplificação e dissociação do gene pesquisado IFNR1.



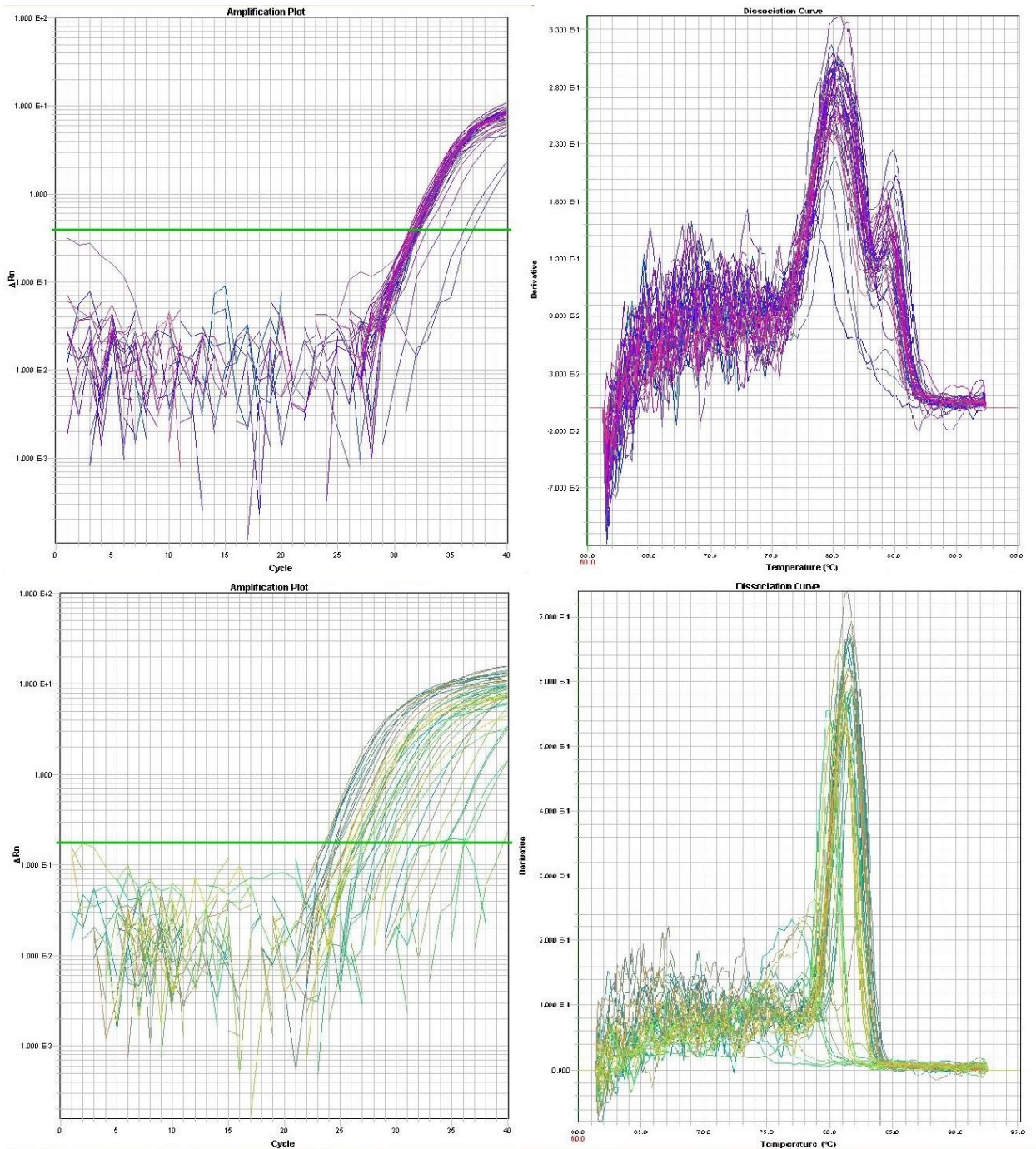


**Gráfico 19:** Valores da normalização matemática do  $\Delta\Delta C_t$ , que representa o número de vezes que o gene IFNR1 foi expresso.

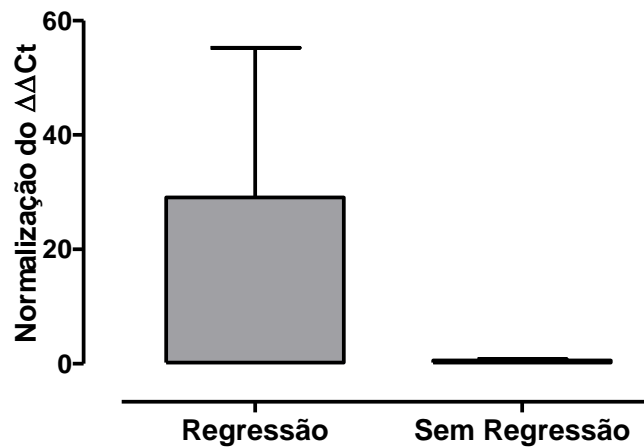
A análise da expressão de IFNR1 demonstra que as pacientes que não obtiveram a regressão da lesão apresentaram uma tendência mais elevada à expressão deste fator. Todavia, a existência de mencionado aumento, este não se revela como estatisticamente significativo.

Diante deste cenário, quando analisada a resposta local ao tratamento, o resultado apontado pode indicar que o IFNR1 está expresso de forma homogênea entre todas as pacientes.

## 5.8 Análise do gene IFNR2



**Figura 9:** Representação gráfica da curva de amplificação (A e C) e da curva de dissociação (B e D) através do software SDS Real Time. **A, B** – Representação gráfica da amplificação e dissociação do gene endógeno  $\beta$ -actina. **C, D** – Representação gráfica da amplificação e dissociação do gene pesquisado IFNR2.

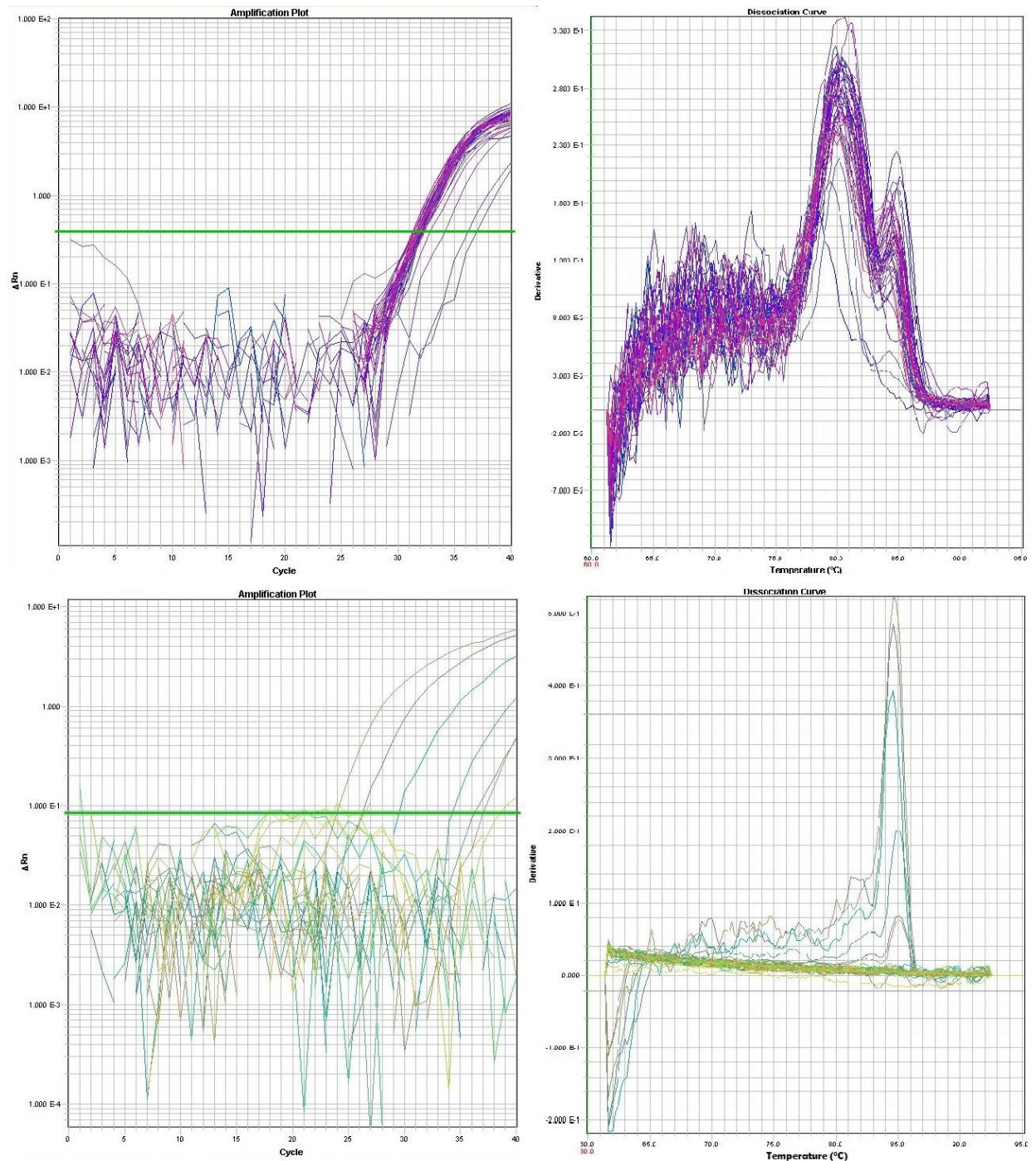


**Gráfico 20:** Valores da normalização matemática do  $\Delta\Delta C_t$ , que representa o número de vezes que o gene IFNR2 foi expresso.

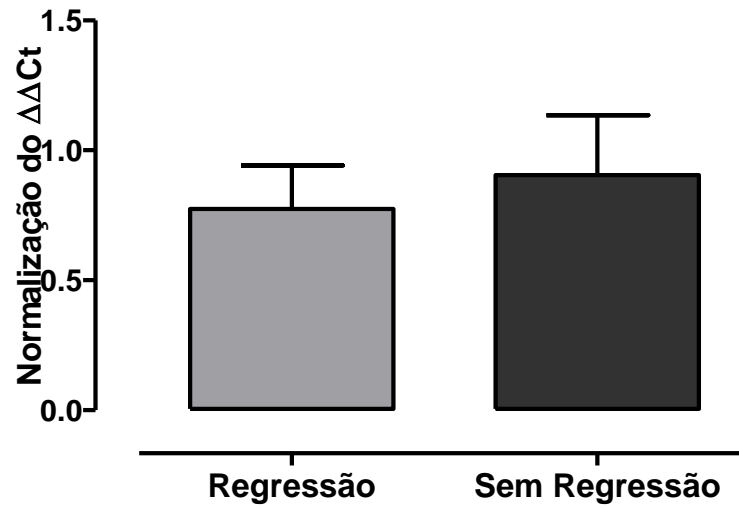
Da análise da expressão de IFNR2 é possível depreender que as pacientes que obtiveram a regressão da lesão apresentaram uma tendência mais elevada à expressão deste fator. Entretanto, em que pese este aumento, o mesmo não é estatisticamente significativo.

O resultado acima descrito pode indicar que IFNR2 está expresso de forma homogênea entre todas as pacientes, quando analisada a resposta local ao tratamento.

## 5.9 Análise do gene IFN- $\alpha$



**Figura 10:** Representação gráfica da curva de amplificação (A e C) e da curva de dissociação (B e D) através do software SDS Real Time. **A, B** – Representação gráfica da amplificação e dissociação do gene endógeno  $\beta$ -actina. **C, D** – Representação gráfica da amplificação e dissociação do gene pesquisado IFN- $\alpha$ .



**Gráfico 21:** Valores da normalização matemática do  $\Delta\Delta C_t$ , que representa o número de vezes que o gene IFN-alpha foi expresso.

A análise da expressão de IFN- $\alpha$  aponta que todas as pacientes do estudo apresentaram um equilíbrio na expressão desta citocina, indicando que o tratamento com Alfapeguinterferona pode ativar vias de produção endógena de IFN- $\alpha$ .

## 6 DISCUSSÃO

A imunoterapia com Alfapeguinterferona propicia o desenvolvimento de importantes funções biológicas, como a ativação de fatores de transcrição e a produção de citocinas específicas para a ativação do sistema imune, a fim de eliminar células neoplásicas e inibir a replicação viral. Estudo realizado por Dunn e colaboradores (2005) demonstrou que o IFN- $\alpha/\beta$  é importante para a rejeição de sarcomas altamente imunogênicos em camundongos e reduz a proliferação de tumores induzidos por carcinógeno primário.

O aumento significativo da expressão de genes IFNAR1 e IFNR2 tem sido apontado como consequência de diversas infecções virais crônicas, como as hepatites B e C (FRODSHAM et al., 2006; SAITO et al., 2004) e de tumores, como adenocarcinoma (AMBRUS, 2003).

Há também a presença de receptores solúveis de citocinas em fluidos corporais que podem modular a atividade imunológica durante a homeostase e a doença. Receptores solúveis de IFNR2 estão presentes no soro, urina, saliva e líquido peritonal e podem inativar a ação do IFN- $\alpha$  se não houver o acoplamento com IFNR1 na membrana celular (WEERD et al., 2007).

Pesquisa clínica desenvolvida por Bottomley e colaboradores (2009) acompanhou durante cinco anos pacientes com melanoma em tratamento imunoterápico com PEG—IFN- $\alpha$ -2b por via subcutânea. As doses variaram de 6 $\mu$ g/Kg/semana durante oito semanas para 3 $\mu$ g/Kg/semana durante cinco anos. Houve melhora da sobrevida livre de doença, porém, o questionário sobre qualidade de vida mostrou pontos negativos, advindos dos efeitos colaterais do tratamento: dispneia, fadiga e anorexia.

Nosso estudo demonstrou que pacientes que não obtiveram regressão da lesão apresentaram aumento significativo tanto de IFNR1 quanto de IFNR2 em linfócitos TCD4+ durante a 3ª aplicação, quando comparadas com pacientes que obtiveram regressão, porém este aumento não foi mantido na 6ª aplicação. Em linfócitos TCD8+ o número de células marcadas com IFNR1 reduziu significativamente da 3ª para a 6ª aplicação em pacientes que não obtiveram a regressão da lesão. Estes dados demonstram que pacientes não responsivas ao tratamento têm os níveis de IFNR1 e IFNR2 mais elevados que as pacientes que responderam ao tratamento.

Estudo realizado por Vitale e colaboradores (2007) mostrou que a expressão de receptores de IFN do tipo I estava significativamente aumentada em linhagens celulares de



adenocarcinoma pancreático humano pancreáticos do tipo BxPC-3 (linhagem celular mais sensível ao IFN), localizando-se a maioria na membrana. Porém, em linhagem celular resistente ao IFN- $\alpha$  (Panc-1), 60 a 70% das células eram negativas para IFNR2, estando a maioria presente no citoplasma celular.

As linhagens celulares de câncer pancreático humano respondem de forma variável ao IFN- $\alpha/\beta$  e o nível de expressão do receptor IFN de tipo I tem um valor preditivo para os efeitos anti-tumorais do IFN- $\alpha$  (BOOY et al., 2013).

Estudo realizado por Zhang e colaboradores (2010) concluiu que células de tumores de bexiga apresentavam baixa expressão de IFNR1 e IFNR2, comparadas às células de tecido saudável, mostrando resistência ao tratamento imunoterápico com IFN- $\alpha$ .

Outra pesquisa, realizada por Tirone e colaboradores (2009), mostrou que amostras cervicais de biópsias sem neoplasia cervical apresentaram maior expressão do receptor de IFN- $\alpha$  do que aquelas com NICs, enquanto que a expressão simultânea de ambas as subunidades do receptor de IFN- $\alpha$  foi encontrada apenas no grupo controle. Porém, em nosso estudo não foi observado aumento da expressão local de IFNR1 e IFNR2, bem como de IFN $\alpha$  em pacientes responsivas e não responsivas ao tratamento.

A interação dos IFNRs com os fatores transcricionais citoplasmáticos é de suma importância para a ativação de genes ativadores da resposta imune. Pesquisas demonstram que a capacidade de ligação ao DNA e de transativação dos fatores de transcrição ISGF-3 estão diminuídas em células que expressam a proteína E6 do HPV-18, após tratamento com IFN- $\alpha$ . As proteínas E6 do HPV interagem fisicamente com Tyk2, impedindo a fosforilação de STAT1 e STAT2 (LI et al., 1999).

A família do Fator Regulador de IFN- $\alpha$  abarca vários genes envolvidos na resposta antiviral, entre eles IRF-3 e IRF-7, que são os mais importantes moduladores da expressão de IFN- $\alpha$  através da ativação por TBK1/IKK (SOLIS et al, 2006; COLLONA et al., 2007).

A ativação de linfócitos T citotóxicos envolve células dendríticas plasmocitóides, consideradas células produtoras naturais de IFN- $\alpha$ . Em estudo desenvolvido por Au e colaboradores (2012) observou-se que a ativação destas células depende da via do IRF7, através da ativação de TRL-9.

Camundongos *knockout* para IRF-7 possuem redução acentuada nos níveis séricos de IFN- $\alpha$  e são mais vulneráveis à infecção viral, mostrando que a via de ativação através do IRF-7 pode ser essencial nas respostas sistêmicas antivirais ativadas por IFN- $\alpha$  pela imunidade inata antiviral (HONDA et al., 2005).

Ao analisar a resposta imune sistêmica através da avaliação da presença de IRF-7 em linfócitos T auxiliares e citotóxicos, podemos observar que em pacientes que não obtiveram a regressão da lesão, apesar de demonstrarem aumento de células positivas durante a 3ª aplicação, este não se manteve. Tal resultado aponta para a impossibilidade de manutenção desta via em pacientes não responsivas, apesar da tentativa de ativação por IRF7 durante a 3ª aplicação.

O papel do IRF-7 na produção do IFN- $\alpha$ , bem como no aumento da capacidade tumoricida de células fagocíticas foi demonstrado em estudo de Goubau e colaboradores (2009), onde o IRF-7 aumentou a expressão de uma ampla gama de genes Interferon-estimulados, citocinas imunomoduladoras e genes envolvidos no processamento e apresentação de antígenos.

Quando estão ativados, os monócitos são capazes de eliminar células neoplásicas de forma eficaz. Estudo desenvolvido por Solis e colaboradores (2006) demonstrou que através da transdução da forma ativa do IRF-7 é possível aumentar a produção de IFN- $\alpha$ , suprarregular genes alvos e potencializar a atividade tumoricida destas células. Nosso estudo demonstrou que a expressão de IRF7 em macrófagos foi estável em todas as pacientes durante as etapas do tratamento com Alfafequinterferona. Porém, a produção de IFN- $\alpha$  em monócitos tende a aumentar em pacientes que obtiveram a regressão da lesão.

Estudo desenvolvido como piloto para a produção de monócitos ativados em larga escala para uso clínico em pacientes com câncer (células MAK) concluiu que macrófagos ativados por Interferon- $\gamma$  transduzidos com IRF-7 eram capazes de produzir IFNs do tipo I e apresentavam um aumento da expressão de genes que codificam o ligante de indutor de apoptose relacionado ao TNF- $\alpha$  (ROMIEU-MOUREZ et al., 2006).

Outro estudo, ao comparar os transcriptomas de células tumorais primárias e metastáticas em um modelo de camundongo com metástase óssea espontânea, descobriu que um número substancial de genes suprimidos em metástases ósseas são alvos de IRF-7. A restauração de IRF-7 nas células tumorais ou a administração de IFN- $\alpha$  levou à redução de metástases ósseas e aumentou a sobrevida. A relevância clínica destes achados foi confirmada em mais de 800 pacientes em que a alta expressão de IRF-7 em tumores primários foi associada com sobrevida livre de metástases ósseas. Portanto, este gene pode identificar pacientes que poderiam se beneficiar com imunoterapias (BIDWELL et al., 2012).

Dados clínicos e experimentais têm demonstrado que o tratamento com citocinas, local e sistemicamente, são capazes de induzir a regressão de tumores. Moltó e colaboradores (1994) concluíram que pacientes com tumor de bexiga, após tratamento profilático intra-



vesical com IFN- $\alpha$ , não apresentaram recorrência da doença e obtiveram aumento significativo da resposta proliferativa em células mononucleares periféricas frente à estimulação mitogênica.

Pacientes com condiloma acuminado genital crônico causado por HPV e condiloma acuminado gigante de Buschke-Löwenstein tratados com IFN- $\alpha$ 2a e IFN- $\alpha$ 2b recombinantes apresentaram redução das lesões e aumento da taxa de remissão completa da doença (GROSS et al., 1986; ZACHARIAE et al., 1988; GEUSAU et al., 2000, PETERSEN et al., 1991, BROKMEYER et al., 2006).

Existe um relato de caso de uma gravidez bem sucedida após a paciente ter sido tratada com IFN- $\alpha$  2b intralesional para tumor vaginal, demonstrando que o tratamento conservador é favorável e eficiente para mulheres jovens em idade reprodutiva (MURTA e TAVARES-MURTA, 2004).

O tratamento conservador com IFN- $\alpha$  para pacientes com NIC II/III tem a vantagem de preservar a capacidade reprodutiva. Estudo realizado por Ramos e colaboradores (2010) demonstrou que pacientes com uma resposta satisfatória (60%) ao tratamento com IFN- $\alpha$ 2b expressaram mais citocinas do perfil Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2), com uma redução significativa da carga viral do HPV de alto risco. As pacientes com falência terapêutica eram fumantes e tiveram maior expressão de citocinas do tipo Th2 (IL-4) ou Treg (TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3).

A produção de citocinas no microambiente tumoral possui influência na expressão de fatores transcricionais. Estudo realizado por Nguyen e colaboradores (2000) demonstrou que a ausência de STAT-1 provoca a inibição da via de IFN- $\alpha/\beta$  e as citocinas produzidas induzem a expressão de IFN- $\gamma$ . Estes resultados indicam que as vias de ativação de IFNs tipo 1 ocorrem por meio de mecanismos STAT-1-dependentes e que a indução eficaz da expressão de IFN- $\gamma$  por IFN- $\alpha/\beta$  requer a regulação de STAT-1. Esta via é importante para a ativação de respostas imunes inatas e adaptativas contra infecções virais.

O fator de transcrição STAT-1 controla a via de ativação de IFNs tipo I, desempenhando importante papel nas respostas mediadas por IFN- $\alpha$  (IMPROTA e PINE, 1997). Na ausência de STAT1, a produção endógena de IFN tipo I possui atividade antiproliferativa e aumenta a sobrevivência de linfócitos T CD4 + e T CD8 + (TANABE et al., 2005).

Estudo desenvolvido por Durbin e colaboradores (1996) mostrou a especificidade fisiológica de STAT1 na via de ativação do IFN- $\alpha$  através de camundongos deficientes em

STAT-1. Estes exibiram nula capacidade de resposta aos IFNs e tornaram-se altamente sensíveis às infecções virais. Porém, foram capazes de responder a outras citocinas.

Outros estudos, todavia, demonstraram que em camundongos *knockout* para STAT1 pode haver resposta proliferativa de monócitos ao IFN- $\alpha$ , indicando a existência de vias alternativas independentes de STAT1 (GIL et al., 2001; MALMGAARD et al., 2002).

Nosso estudo demonstrou que houve aumento significativo de linfócitos T CD4+ marcados com STAT-1 nas pacientes que não obtiveram regressão da lesão durante a terceira aplicação, porém este aumento não foi mantido até a 6ª aplicação. Este resultado demonstra a tentativa de resposta frente ao tratamento com Alfapeguinterferona, que não foi mantida e, portanto, não eliminou a lesão.

Pesquisa com células tronco hematopoéticas pontuou que o tratamento com IFN- $\alpha$  ativou o ciclo celular, aumentando a fosforilação de STAT1. Porém, células negativas para IFNRs não demonstraram sensibilidade ao tratamento (ESSERS et al., 2009).

Diversos estudos têm demonstrado que a imunoterapia com Alfapeguinterferona pode ter sua eficácia aumentada e toxicidade diminuída quando administrada por via subcutânea, além de proporcionar a redução de metástases, aumento da capacidade de apresentação de antígenos e atividade citotóxica pelo sistema imune (MOTZER et al, 2001; ROOZENDAL et al., 2003; PUCCHIO et al., 2006).

Ao estudar o infiltrado inflamatório no microambiente tumoral, Silva e colaboradores (2010), concluíram que há predomínio de linfócitos CD3+ e CD20+ em pacientes com NIC III em comparação com amostras de pacientes com câncer invasivo e que a migração de células parece ser proporcional à progressão da lesão. Outro estudo mostrou que há a expressão positiva de linfócitos T CD3+ em pacientes com recorrência, após conização por NIC III (MALUF et al., 2008).

Pesquisa desenvolvida por Michelin e colaboradores (2015) mostrou que pacientes com NIC II e III tratadas com Alfapeguinterferona que obtiveram boa resposta à imunoterapia apresentaram maior produção de IFN- $\gamma$  e TNF $\alpha$  em linfócitos TCD4+, bem como menor produção de IL-2, IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , mostrando que estas pacientes obtiveram regressão dependente de resposta Th1.

Para aprofundar a análise do perfil de resposta Th1 é possível estudar o principal fator de transcrição (Tbet) envolvido na ativação de genes responsáveis pela produção de citocinas que favorecem este perfil de resposta, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12.

Estudo desenvolvido por Lazarevic e colaboradores (2011) demonstrou que a expressão de T-bet tem um papel regulador no desenvolvimento da linhagem Th17, pois

verificou-se que T-bet exerceu um efeito negativo sobre a expressão do gene que codifica ROR $\gamma$ t (Rorc) e genes que codificam citocinas Th17.

Pacientes com câncer colorretal que possuem alta expressão de Th17 apresentam mau prognóstico, enquanto pacientes com alta expressão de Th1 apresentaram sobrevida livre de doença. A análise combinada de células Th1 e Th17 possibilitou uma melhor capacidade de discriminar a evolução da doença. A análise *in situ* da densidade de células IL17+ e células CD8+ em tecidos tumorais confirmou os resultados. Estes achados apontam que Th1 e Th17 funcionais produzem efeitos opostos na sobrevivência do paciente no câncer colorretal e fornecem informações complementares que podem melhorar o prognóstico (TOSOLINI et al., 2011).

A evidência de infiltrado inflamatório indica que, embora pacientes com câncer exibam um estado imunossupressor generalizado, a reação inflamatória no local do tumor pode promover o crescimento e a progressão deste. A perpetuação da inflamação crônica é produzida através de cadeias de *feedback* positivo, que incluem células inflamatórias produzindo citocinas que induzem a síntese de quimiocinas em células malignas e estromais, levando ao recrutamento prolongado de células inflamatórias no microambiente tumoral. Estudos têm demonstrado que o aumento de células Th17 intratumoral em pacientes com câncer cervical pode levar à diminuição da recorrência (YU et al., 2014). Esta pesquisa vem em direção a outros estudos em tumores de ovário e melanoma (MURANSKI et al, 2008).

Em pacientes com carcinoma hepatocelular e câncer colorretal, altos níveis de células Th17 intratumorais foram associados ao mau prognóstico (ZHANG et al, 2009; LIU et al., 2011). Em contrapartida, outros estudos têm demonstrado que células Th17 podem favorecer o aumento da imunidade citotóxica e, portanto, exercer efeitos supressores de tumor (MARTIN-OROZCO, et al., 2009).

Nosso estudo demonstrou que há um aumento significativo da expressão local de ROR $\gamma$ T em pacientes que não obtiveram regressão da lesão, porém a expressão de Tbet mostrou-se equilibrada entre os grupos estudados. Este resultado aponta que a presença de infiltrado inflamatório com linfócitos do tipo Th17 no colo uterino das pacientes não responsivas pode estar associado ao insucesso do tratamento nestas pacientes. Estes dados sugerem que podem existir mecanismos de escape tumoral que impedem a eliminação da lesão pela imunomodulação por Alfafequinterferona.

## 7 CONCLUSÕES

A responsividade sistêmica referente à imunidade celular e ao IFN- $\alpha$  em pacientes com Neoplasia Intraepitelial tratadas com Alfapeguinterferona indica que pacientes não responsivas ao tratamento possuem níveis elevados de IFNR1 e IFNR2 em linfócitos TCD4+. Em linfócitos TCD8+ o número de células marcadas com IFNR1 reduziu significativamente da 3<sup>a</sup> para a 6<sup>a</sup> aplicação em pacientes que não obtiveram a regressão da lesão, demonstrando que, apesar da tentativa de resposta, esta não se manteve para a eliminação da lesão.

Ao avaliar a integridade da via de ativação do IFN- $\alpha$  em linfócitos T auxiliares e citotóxicos, sistemicamente, através da avaliação da presença dos fatores transcricionais STAT1 e IRF7, podemos observar que em pacientes que não obtiveram a regressão da lesão, apesar de demonstrarem aumento de células positivas durante a 3<sup>a</sup> aplicação, este não se manteve. Tal resultado aponta para a impossibilidade de manutenção desta via em pacientes não responsivas, apesar da tentativa de ativação durante a 3<sup>a</sup> aplicação.

Ao avaliar a expressão local de IFNRs e do IFN- $\alpha$ , concluímos que não foi observado aumento da expressão local de IFNR1 e IFNR2, bem como de IFN $\alpha$  em pacientes responsivas e não responsivas ao tratamento.

Ao realizar a análise da plasticidade de linfócitos T no tecido lesionado, comparando a pré-terapia com a pós-terapia, através da avaliação dos fatores de transcrição relacionados à resposta Th1 (T-bet) e Th17 (ROR $\gamma$ T), concluímos que há um aumento significativo da expressão local de ROR $\gamma$ T em pacientes que não obtiveram regressão da lesão, porém a expressão de Tbet mostrou-se equilibrada entre os grupos estudados, apontando que a presença de infiltrado inflamatório com linfócitos do tipo Th17 no colo uterino das pacientes não responsivas pode estar associado ao insucesso do tratamento nestas pacientes.

## REFERÊNCIAS

- ALARCÓN-RIQUELME, M. Nucleic acid by-products and chronic inflammation. **Nature Genetics** 38, 866 - 867 (2006)
- AMBRUS, J. L.; DEMBINSKI, W.; AMBRUS, J. L. JR.; SYKES, D. E.; AKHTER, S. et al. Free Interferon- $\gamma$  Receptors in the Circulation of Patients with Adenocarcinoma. **Cancer**. December 15, V 98, N 12, 2003
- AU, W. C.; YEOW, W.S.; PITHA, P.M. Analysis of Functional Domains of Interferon Regulatory Factor 7 and Its Association with IRF-3. **Virology**. V. 280, N. 2, Feb 2001
- BACHMANN, A.; HANKE, B.; ZAWATZKY, R.; SOTO, U.; RIGGELEN, J.; HAUSEN, H.; RÖSL, F. Disturbance of Tumor Necrosis Factor Alpha-Mediated Beta Interferon Signaling in Cervical Carcinoma Cells. **J. Virol**. V. 76, N. 1. Nov. 2001
- BAR-AM, A.; DANIEL, Y.; RON, I.G.; NIV, J.; KUPFERMINC, M.J.; BORNSTEIN, J.; LESSING, J.B. Combined colposcopy, loop conization, and laser vaporization reduces recurrent abnormal cytology and residual disease in cervical dysplasia. **Gynecol Oncol**. 2000 Jul;78(1):47-51.
- BARKER, B.; GARCIA, F.; LOZEVSKI, J.; WARNER, J.; HATCH, K. The correlation between colposcopically directed cervical biopsy and loop electrosurgical excision procedure pathology and the effect of time on that agreement. **Gynecol Oncol**. 2001 Jul; 82(1):22-6.
- BIDWELL, B. N.; SLANEY, C. Y.; WITHANA, N. P.; FOSTER, S.; CAO, Y.; LOI, S.; ANDREWS, D.; MIKESKA, T.; MANGAN, N.; SAMARAJIWA, S. A.; WEERD, N. A.; GOULD, J.; ARGANI, P.; MÖLLER, A.; SMYTH, M.J.; ANDERSON, R. L.; HERTZOG, P.J.; PARKER, B. S. Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape. **Nature Medicine**. 18, 1224–1231, jul, 2012
- BOCCARDO, E.; LEPIQUE, A. P.; VILLA, L. L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis**. 2010, 31 (11): 1905-1912.
- BOOY, S.; VAN EIJCK, C. H. J.; DOGAN, F.; VAN KOETSVELD, P. M.; HOFLAND, L. J. Influence of type-I Interferon receptor expression level on the response to type-I Interferons in human pancreatic cancer cells. **J. Cell. Mol. Med**. Vol 18, No 3, 2014
- BOTTOMLEY, A.; COENS, C.; SUCIU, S. Adjuvant Therapy With Pegylated Interferon Alfa-2b Versus Observation in Resected Stage III Melanoma: A Phase III Randomized Controlled Trial of Health-Related Quality of Life and Symptoms by the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group. **J Clin Oncol** v. 27, n. 18 :2916-2923. June 2009
- BOULET, G. B.; HORVATH, C.; BROECK, D.V.; SAHEBALI, S.; BORGERS, J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 39, 2007

- BROCKMEYER, N. H.; POFFHOFF, A.; BADER, A.; HOCHDORFER, B.; SCHLOTTMANN, R.; RASOKAT, H.; ALTMAYER, P.; KREUTER, A. for the german network of competence hiv/aids. Treatment of condylomata acuminata with pegylated Interferon alfa-2b in hiv-infected patients. **Eur j med res** (2006) 11: 27-32.
- BRUNI, L.; BARRIONUEVO-ROSAS, L.; ALBERO, G.; SERRANO, B.; MENA, M.; GÓMEZ, D.; MUÑOZ, J.; BOSCH, F.X.; DE SANJOSÉ, S.I.C.O. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. **Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre)**. Summary Report 15 December 2016.
- BUKOWSKI, R.; ERNSTOFF, M. S.; GORE, M. E.; NEMUNAITIS, J. J.; AMATO, R.; GUPTA, S. K.; TENDLER, C. L. Pegylated Interferon Alfa-2b Treatment for Patients With Solid Tumors: A Phase I/II Study. **Clin Oncol** 20:3841-3949, 2002
- CHANG, Y. E.; LAIMINS, L. A. Microarray Analysis Identifies Interferon-Inducible Genes and Stat-1 as Major Transcriptional Targets of Human Papillomavirus Type 31. **Journal of Virology**. V. 74. N. 9. May 2000
- CHEN, D.; HU, Q.; MAO, C.; JIAO, Z.; WANG, S.; YU, L. et al. Increased IL-17-producing CD4(+) T cells in patients with esophageal cancer. **Cell Immunol**. 2012;272: 166–174.
- CLARK, R.; OLSON, K.; FUH, G. et al. Long-acting growth hormones produced by conjugation with polyethylene glycol. **J Biol Chem**. 1996; 271:21969–21977.
- COLONNA, M. TLR pathways and IFN-regulatory factors: To each its own. **Eur. J. Immunol**. 2007. 37: 306–309
- DANIEL, D.; MEYER-MORSE, N.; BERGSLAND, E.K.; DEHNE, K.; COUSSENS, L.M.; HANAHAN, D. Immune enhancement of skin carcinogenesis by CD4+ T cells. **J Exp Med** 2003, 197:1017-1028.
- DARNELL, J.E. STATs and gene regulation. **Science**, 277 (1997), pp. 1630–1635
- DARNELL, J.E.; KERR, I.M.; STARK, G.R. JAK–STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular proteins. **Science**, 264 (1994), pp. 1415–1421
- DELORENZO, B. H.; RAMOS, M. C.; MICHELIN, M.A.; MURTA, E. F. C. Progress in the use of immunotherapy to treat uterine cervical cancer. **Tumori**, 95: 1-7, 2009
- DELGADO, C.; FRANCIS, G.E.; FISHER, D. The uses and properties of PEG-linked proteins. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**. 1992; 9:249–304.
- DONNELLY, R. P. & KOTENKO, S. V. Interferon- $\lambda$ : a new addition to an old family. **J. Interferon Cytokine Res**. 30, 555–564 (2010).
- DUNN, G.P.; BRUCE, A.T.; SHEEHAN, K.C.; SHANKARAN, V.; UPPALURI, R. et al.: A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. **Nat Immunol** 2005, 6:722-729.

- DUPUIS, S.; JOUANGUY, E.; AL-HAJJAR, S.; FIESCHI, C.; et al. Impaired response to interferon- $\alpha/\beta$  and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. **Nature Genetics**. V. 33, march 2003
- DURBIN, J.E.; HACKENMILLER, R.; SIMON, M.C.; LEVY, D.E. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. **Cell**. 1996 Feb 9; 84(3):443-50.
- EISENRING, M.; BERG, V.; KRISTIANSEN, G.; SALLER, E.; BECHER, B. IL-12 initiates tumor rejection via lymphoid tissue-inducer cells bearing the natural cytotoxicity receptor NKp46. **Nature Immunology**. Oct. 2010
- ESCUDIER, B.; SZCZYLIK, C.; HUTSON, T. E. et al. Randomized Phase II Trial of First-Line Treatment With Sorafenib Versus Interferon Alfa-2a in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. **J Clin Oncol** v.27, n.08, march 2009
- ESSERS, M. A. G.; OFFNER, S.; BLANCO-BOSE, W. E.; WAIBLER, Z. et al. IFN- $\alpha$  activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. **Nature**, Vol 458, 16 April 2009
- FEHNIGER, T. A. et al. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. **J. Immunol**. 162, 4511–4520 1999
- FERNANDES, P.C. Jr.; GARCIA, C.B.; MICHELI, D.C.; CUNHA, F.Q.; MURTA, E.F.C.; TAVARES-MURTA, B.M. Circulating neutrophils may play a role in the host response in cervical cancer. **Int J Gynecol Cancer**, v. 17, n.5, p. 1068–74, 2007.
- FIorentino, B.; DI STEFANO, P.; GIULIANI, C.; AMATETTI, C.; TINARIL, N.; NATOLI, C.; GARUFI, C.; IACOBELLI, S. Immunological effects of alternative weekly Interferon-alpha-2b and low dose interleukin-2 in patients with cancer. **Br. J. Cancer**, 66, 981–983, 1992
- FLANIGAN, R. C., SALMON, S. E., BLUMEINSTEIN, B. A., et al. Nephrectomy Followed By Interferon Alfa-2b Compared With Interferon Alfa-2b Alone For Metastatic Renal-Cell Cancer. **Clin Oncol** V. 345, n. 23, december 2001
- FRODSHAM, A. J.; ZHANG, L.; DUMPIS, U.; TAIB, N. A. M.; BEST, S.; et al. Class II cytokine receptor gene cluster is a major locus for hepatitis B persistence. **PNAS**. V. 103, N 24, 2006
- GEUSAU, A.; HEINZ-PEER, G.; VOLC-PLATZER, B.; STINGL, G.; KIRNBAUER, R. Regression of Deeply Infiltrating Giant Condyloma (Buschke-Löwenstein Tumor) Following Long-term Intralesional Interferon Alfa Therapy. **Archives of dermatology**, Vol 136, No. 6 June 2000
- GIL, M.P.; BOHN, E.; O'GUIN, A. K.; RAMANA, C.V.; LEVINE, B.; STARK, G.R.; VIRGIN, H.W.; SCHREIBER, R.D. Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling. **PNAS** June 5, vol. 98, no. 12, 2001
- GLUE, P.; FANG, J.W.; ROUZIER-PANIS, R.; et al. Pegylated interferon- $\alpha$ 2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. **Clin Pharmacol Ther**. 68:556–567, 2000

- GOUBAU, D.; ROMIEU-MOUREZ, R.; SOLIS, M.; HERNANDEZ, E.; MESPLÈNDE, T.; LIN, R.; LEAMAN, D.; HISCOTT, J. Transcriptional re-programming of primary macrophages reveals distinct apoptotic and anti-tumoral functions of IRF-3 and IRF-7. **European Journal Immunology**. V., 39, N. 2, Feb.2009
- GRAVITT, P.E.; JAMSHIDI, R. Diagnosis and Management of Oncogenic Cervical Human Papillomavirus Infection. **Infect. Dis. Clin. N. Am.** v. 19, 2005
- GROSS, G.; IKENBERG, H.; ROUSSAKI, A.; DREES, N.; SCHÖPF, E. Systemic treatment of condylomata acuminata with recombinant interferon-alpha-2a: low-dose superior to the high-dose regimen. **Chemotherapy**. 32(6):537-41, 1986
- HAUSCHILD, A.; WEICHENTHAL, M.; RASS, K. et al..Prospective Randomized Multicenter Adjuvant Dermatologic Cooperative Oncology Group Trial of Low-Dose Interferon Alfa-2b With or Without a Modified High-Dose Interferon Alfa-2b Induction Phase in Patients With Lymph Node–Negative Melanoma. **J Clin Oncol** v.27, n.21, July 2009
- HERTZOG, P. J.; WILLIAMS, B. R. Fine tuning type I interferon responses. **Cytokine Growth Factor Rev.** 24, 217–225, 2013
- HISCOTT, J. Triggering the Innate Antiviral Response through IRF-3 Activation. **Journal of biological chemistry**. V 282. N. 21 Maio 25, 2007
- HONDA, K.; YANAI, H.; NEGISHI, H.; ASAGIRI, M.; et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. **Nature**, V. 434, 2005
- HONG, S.; MEHTA, K. P.; LAIMINS, L. A. Suppression of STAT-1 Expression by Human Papillomaviruses is Necessary for Differentiation-Dependent Genome Amplification and Plasmid Maintenance. **Journal of Virology**, Sept. 2011
- IHLE, J.N.; KERR, I.M. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily **Trends Genet.**, pp. 69–74, 1995
- IMPROTA, T.; PINE, R. Susceptibility to virus infection is determined by a stat-mediated response to the autocrine effect of virus-induced type I Interferon. **Cytokine**, volume 9, number 6, 1997
- ISAACS, A.; LINDENMANN, J. Virus Interference. I. The Interferon. **Proceedings the Royal Society of London**, 1957
- IVANOV, I.I., MCKENZIE, B.S., ZHOU, L., TADOKORO, C.E., LEPELLEY, A., LAFAILLE, J.J., CUA, D.J., LITTMAN, D.R. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ mat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell**. 126(6):1121-33, 2006
- JAMES, C.D., HE, J., CARLBOM, E., NORDENSKJOLD, M., CAVENEE, W.K., COLLINS, V.P. Chromosome 9 deletion mapping reveals interferon alpha and interferon beta-1 gene deletions in human glial tumors. **Cancer Res.** 15;51(6):1684-8, 1991
- JOSEFOWICZ, S.Z.; RUDENSKY, A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. **Immunity** 30, 616–625, 2009



KAUFMANN, R.; SPIETH, K.; LEITER, U.; MAUCH, C.; et al. Temozolomide in combination with interferon-alfa versus temozolomide alone in patients with advanced metastatic melanoma: a randomized, phase III, multicenter study from the dermatologic cooperative oncology group. **Journal of clinical oncology**. V.23, n. 35, december 2005

KLAMPFER, L.; HUANG, J.; CORNER, G.; MARIADASON, J.; ARANGO, D.; SASAZUKI, T.; SHIRASAWA, S.; AUGENLICHT, L. Oncogenic Ki-Ras Inhibits the Expression of Interferon-responsive Genes through Inhibition of STAT1 and STAT2 Expression. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 278, N. 47, 2003

KRUIT, W.H.J.; GOEY, S.H.; CALABRESI, F.; LINDEMANN, A.; STAHEL, R.A.; POLIWODA, H.; OSTERWALDER, B.; STOTER, G. Final report of a phase H study of interleukin 2 and interferon a in patients with metastatic melanoma. **British Journal of Cancer** (195 71,1319-1321, 1995

KURMAN, R.J.; SOLOMON, D. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. **Springer-Verlag**, 1994.

LAZAREVIC, V., CHEN, X.; SHIM, J. H.; HWANG, E. S.; JANG, E.; et al. Transcription factor T-bet represses Th17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the ROR $\gamma$ t gene. **Nat Immunol**. 12(1): 96–104, 2011

LEVY, D.E. Interferon induction of gene expression through the JAK-STAT pathway. **Semin. Virol**. p. 181-189, 1995

LEVY, D.E.; DARNELL, J.E. Interferon-dependent transcriptional activation signal transduction without second messenger involvement? **New Biol.**, p. 923–928, 1990

LI, S.; LABRECQUE, S.; GAUZZI, M.C.; CUDDIHY, A.R.; WONG, A.H. et al. The human papilloma virus HPV-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon-alpha. **Oncogene**. 18(42):5727-5737, 1999

LINDEQUE, B. G. Management of cervical premalignant lesions. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**. 19 (4):545-61. Epub 2005 Mar 26

LIU, J.; DUAN, Y.; CHENG, X.; CHEN, X.; XIE, W.; LONG, H. et al. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. **Biochem Biophys Res Commun**. 407: 348–354, 2011

MALMGAARD, L.; SALAZAR-MATHER, T. P.; LEWIS, C. A.; BIRON, C. A. Promotion of Alpha/Beta Interferon Induction during In Vivo Viral Infection through Alpha/Beta Interferon Receptor/STAT1 System-Dependent and -Independent Pathways. **J. Virol**. 76(9):4520, 2002

MALUF, P.J.; ADAD, S.J.; MURTA, E.F.C. Outcome after conization for cervical intraepithelial neoplasia grade III: relation with surgical margins, extension to the crypts and mitoses. **Tumori**, 90: 473-477, 2004

MALUF, P.J.; MICHELIN, M.A.; ETCHEBEHERE, R.M.; ADAD, S.J.; MURTA, E.F.C. 22 T lymphocytes (CD3) may participate in the recurrence of cervical intraepithelial neoplasia 23 grade III. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, p. 1-3, 2008.

- MARIÉ, I., DURBIN, J. E., LEVY, D.E. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. **EMBO J.** 16;17(22): 6660–6669, 1998
- MARTIN-OROZCO, N.; MURANSKI, P.; CHUNG, Y.; YANG, X.O.; YAMAZAKI, T.; LU, S. et al. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. **Immunity.** 31: 787–798, 2009
- MICHALLET, M.; MALOISEL, F.; DELAIN, M.; HELLMANN, A.; ROSAS, A.; SILVER, R.T.; TENDLER, C.; for the PEG-Intron CML Study Group. Pegylated recombinant interferon alpha-2b vs recombinant interferon alpha-2b for the initial treatment of chronic-phase chronic myelogenous leukemia: a phase III study. **Leukemia** 18, 309–315, 2004
- MICHELIN, M.A., MONTES, L., NOMELINI, R. S., TROVÓ, M. A., MURTA, E. F. C. Helper T Lymphocyte Response in the Peripheral Blood of Patients with Intraepithelial Neoplasia Submitted to Immunotherapy with Pegylated Interferon- $\alpha$ . **Int. J. Mol. Sci.** 16, 5497-5509, 2015
- MICHELIN, M.A.; MURTA E.F.C. Potential therapeutic, vaccine strategies and relevance of immune system in uterine cervical cancer. **Eur J Gynaecol Oncol**, v. 29, n.2, p. 10-18, 2008
- MITTAL D, KASSIANOS AJ, TRAN LS, BERGOT AS, GOSMANN C, HOFMANN J, BLUMENTHAL A, LEGGATT GR, FRAZER IH. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity contributes to local immune suppression in the skin expressing human papillomavirus oncoprotein E7. **J Invest Dermatol.** 2013
- MOLTO, L.; ALVAREZ-MON, M.; CARBALLIDO, J.; MANZANOL, L.; GUILLEN, C.; PRIETO, A.; OLIVIER, C.; RODRIGUEZ-ZAPATA, M. Intracavitary prophylactic treatment with Interferon alpha 2b of patients with superficial bladder cancer is associated with a systemic T-cell activation. **British Journal of Cancer.** 70, 1247-1251, 1994
- MOLTO, L.; CARBALLIDO, J.; MANZANO, L.; REYES, E.; OLIVIER, C.; ALVAREZ-MON, M. Prophylactic intracavitary treatment with Interferon alpha increases interferon gamma production by peripheral blood mononuclear cells in patients with superficial transitional cell carcinoma of the bladder. **British Journal of Cancer** 75(12), 1849-1853, 1997
- MOSMANN TR, CHERWINSKI H, BOND MW, GIEDLIN MA, COFFMAN RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol.** 1;136(7):2348-57, 1986
- MOTZER, R. J.; HUTSON, T. E.; TOMCZAK, P. et al. Overall Survival and Updated Results for Sunitinib Compared With Interferon Alfa in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. **J Clin Oncol** v.27, n.22, :3584-3590, 2009
- MOTZER, R. J.; RAKHIT, A.; GINSBERG, M.; RITTWEGER, K.; VUKY, J.; YU, R.; FETTNER, S.; HOOFTMAN, L. Phase I Trial of 40-kd Branched Pegylated Interferon Alfa-2a for Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. **Clin Oncol** 19:1312-1319, 2001

- MÜLLER, M.; BRISCOE, J.; LAXTON, C.; BUSCHLIN, D.; et al. The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon- $\alpha/\beta$  and - $\gamma$  signal transduction **Nature**. p. 129–135, 1993
- MÜNGER, K.; BALDWIN, H.M.E.; HIROYUKI, H. et al. Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. **Journal of Virology**. v. 78, n. 21, 2004
- MURANSKI, P.; BONI, A.; ANTONY, P.A.; CASSARD, L.; IRVINE, K.R.; KAISER, A. et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. **Blood**. 112: 362–373, 2008
- MURTA EFC, CONTI R, RODOVALHO J, BARCELOS AC, ADAD SJ, DE SOUZA H. Outcome after treatment of high-grade squamous intraepithelial lesions: relation between colposcopically directed biopsy, conization and cervical loop excision. **Eur J Gynaecol Oncol**. 25 (5):587-90, 2004
- MURTA, E. F. C.; RESENDE, A. V.; SOUZA, M. A. H.; ADAD, S. J.; SALUM, R. Importance of surgical margins in conization for cervical intraepithelial neoplasia grade III. **Archives of Gynecology and Obstetrics**. V. 263, N.2, p 42-44, 1999
- MURTA, E.F.C.; TAVARES-MURTA, B.M. Successful pregnancy after vaginal cancer treated with interferon. **Tumori**, v. 90, n. 2, p. 247–8, 2004
- NASIRUDEEN, A.M.; WONG, H.H.; THIEN, P.; XU, S.; LAM, K.P.; LIU, D.X. RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. **PLoS Negl Trop Dis**. 5:926, 2011
- NATOLI, C.; GARUFI, C.; TINARIL, N.; D'EGIDIOL, M.; LESTI, G.; GASPARI, L. A.; VISINI, R.; IACOBELLIL, S. Dynamic test with recombinant Interferon-alpha-2b: effect on 90K and other tumour-associated antigens in cancer patients without evidence of disease. **Br. J. Cancer**. 67, 564-567, 1993
- NGUYEN KB, COUSENS LP, DOUGHTY LA, PIEN GC, DURBIN JE, BIRON CA. Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. **Nature Immunology**. 1(1):70-76, 2001
- NOMELINI R.S.; MARDEGAN, M.C.; MURTA, E.F.C. Utilization of Interferon in Gynecologic and Breast Cancer. *Clinical Medicine: Oncology*, v. 1, p. 111–20, 2007
- OBI, S.; YOSHIDA, H.; TOUNE, R.; et al. Combination Therapy of Intraarterial 5-Fluorouracil and Systemic Interferon-Alpha for Advanced Hepatocellular Carcinoma with Portal Venous Invasion. **Cancer**. 106:1990–7, 2005
- PANDEY, A. K. et al. NOD2, RIP2 and IRF5 play a critical role in the type I Interferon response to Mycobacterium tuberculosis. **PLoS Pathog**. 5, 2009
- PETERSEN, C.S.; BJERNING, P.; LARSEN, J.; BLAAKXR, J.; HAGDRUP, H.; FROM, E.; OBERGAARD, L. Systemic interferon alpha-2b increases the cure rate in laser treated patients with multiple persistent genital warts: a placebo-controlled study. **Genitourin Med**. 67: 99-102, 1991
- PRETORIUS RG, BELINSON JL. Colposcopy. **Minerva Ginecol**. 64(2):173-80, 2012

PUCCHIO, T.; PILLA, L.; CAPONE, I. et al. Immunization of Stage IV Melanoma Patients with Melan-A/MART-1 and gp100 Peptides plus IFN- $\alpha$  Results in the Activation of Specific CD8<sup>+</sup> T Cells and Monocyte/Dendritic Cell Precursors. **Cancer Res** 66: (9), 2006

RAMOS, M.C.; MARDEGAN, M.C.; PEGHINI, B.C.; ADAD, S.J.; MICHELIN, M.A.; MURTA, E.F.C. Expression of cytokines in cervical stroma in patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia after treatment with intralesional interferon alpha-2b. **Eur J Gynaec Oncol**, v. 31, n. 5, p. 522-9, 2010

REISER, J.; HURST, J.; VOGES, M.; KRAUSS, P.; MÜNCH, P.; IFTNER, T.; STUBENRAUCH, F. High-Risk Human Papillomaviruses Repress Constitutive Kappa Interferon Transcription via E6 To Prevent Pathogen Recognition Receptor and Antiviral-Gene Expression. **J. Virol.** V. 85. N. 21. Nov. 2011

RICHTER, M.F.; DUMÉNIL, G.; UZÉ, G.; FELLOUS, M.; PELLEGRINI, S. Specific contribution of Tyk2 JH regions to the binding and the expression of the interferon alpha/beta receptor component IFNAR1. **J Biol Chem.** 18;273(38):24723-9, 1998

ROMIEU-MOUREZ, R.; SOLIS, M.; NARDIN, A.; GOUBAU, D.; BARON-BODO, VERONIQUE; LIN, R.; MASSIE, B.; SALCEDO, M.; HISCOTT, J. Distinct Roles for IFN Regulatory Factor (IRF)-3 and IRF-7 in the Activation of Antitumor Properties of Human Macrophages. **Cancer Research**, V.66, N.21, Nov. 2006

ROOZENDAAL, K. J.; DE VALK, B.; TEN VELDEN, J.J.A.; VAN DER WOUDE, H.J.; KROON, B.B.R. Alveolar soft-part sarcoma responding to interferon alpha-2b. **British Journal of Cancer.** 89, 243 – 245, 2003

SAITO A, T.; JIB, G.; SHINZAWAA, H.; OKUMOTOA, K.; HATTORIA, E. et al. Genetic variations in humans associated with differences in the course of hepatitis C. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** V. 317, N. 2, 30 p. 335–341, 2004

SCHAWARZ, T. F.; SPACZYNSKI, M.; SCHNEIDER, A.; WYSOCKI, J.; GALAJ, A.; PERONA, P.; PONCELET, S.; ZAHAF, T.; HAROT, K.; DESCAMPS, D.; DUBLIN, G. Immunogenicity and tolerability of an HPV-13/18 ASO4-adjuvanted prophylactic cervical cancer vaccine in women aged 15-55 years. **Vaccine.** v. 27, 2009

SCHRODER, K., HERTZOG, P. J., RAVASI, T. & HUME, D. A. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. **J. Leukoc. Biol.** 75, 163–189, 2004

SIEGAL, F. P.; KADOWAKI, N.; SHODELL, M.; FITZGERALD-BOCARSLY, P. A.; SHAH, K.; HO, S.; ANTONENKO, S.; LIU, Y.J. The nature of the principal type I Interferon-producing cells in human blood. **Science**, V. 284, Jun. 1999

SILVA, C.S.; MICHELIN, M.A.; ETCHEBEHERE, R.M.; ADAD, S.J.; MURTA, E.F.C. Local lymphocytes and nitric oxide synthase in the uterine cervical stroma of patients with grade III cervical intraepithelial neoplasia. **Clinics**, v. 65, n. 6, p. 575-81, 2010

SOLIS, M.; GOUBAU, D.; ROMIEU-MOUREZ, R.; GENIN, P.; CIVAS, A.; HISCOTT, J. Distinct functions of IRF-3 and IRF-7 in IFN-alpha gene regulation and control of anti-tumor activity in primary macrophages. **Biochem Pharmacol.** 30; 72(11):1469-76, 2006

SOLOMON, D. The ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS)\* Group Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. **Am J Obstet Gynecol.** 188 (6):1383-92, 2003

SOLOMON, D.; DAVEY, D.; KURMAN, R.; MORIARTY, A.; O'CONNOR, D.; PREY, M. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA.** Apr. 24, n°287, v.16, p.2114-2119, 2002

STARK, G.R.; KERR, I.M.; WILLIAMS, B.R.; SILVERMAN, R.H.; SCHREIBER, R.D. How cells respond to interferons. **Annu Rev Biochem.** 67:227-64, 1998

SYMONS, J. A.; ALCAMÍ, A.; SMITH, G. L. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. **Cell.** V. 81, N. 4, p 551-560, 1995

SU, X.; YE, J.; HSUEH, E. C.; ZHANG, Y.; HOFT, D. F.; PENG, G. Tumor Microenvironments Direct the Recruitment and Expansion of Human Th17 Cells. **J Immunol** February 1, 2010, 184 (3) 1630-1641

TANABE, Y.; NISHIBORI, T.; SU, L.; ARDUINI, R. M.; BAKER, D.P.; DAVID, M. Cutting Edge: Role of STAT1, STAT3, and STAT5 in IFN- $\alpha\beta$  Responses in T Lymphocytes. **The Journal of Immunology.** V. 174, N. 2, 609-613, 2005

TAVARES-MURTA, B. M.; RESENDE, A.D. ; CUNHA, F.Q. ; MURTA, E.F.C. Local profile of cytokines and nitric oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,** v. 138, p. 93-9, 2008

TINDLE, R.W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nature Reviews Cancer.** v. 2, 2002

TIRONE N.R.; PEGHINI B.C.; BARCELOS A.C.M.; MURTA E.F.C.; MICHELIN M.A. Local expression of interferon-alpha and interferon receptors in cervical intraepithelial neoplasia. **Cancer immunology, immunotherapy: CII,** v. 58, n. 12, p. 2003-10, 2009

TOSOLINI, M.; KIRILOVSKY, A.; MLECNIK, B.; FREDRIKSEN, T.; MAUGER, S. et al. Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in Patients with Colorectal Cancer. **Cancer Research,** v. 71, n.4, 2011

TRUITT, G.A.; TARBY, C.M.; STEM, L.L.; TAMBORINI, B.; BONTEMPO, J.B.; NALIN, C. Pharmacodynamic and preliminary pharmacokinetic evaluation of pegylated derivatives of interferon- $\gamma$  [abstract]. **Proc Am Assoc Cancer Res.** 35:398, 1994

TSUNODA, S.; ISHIKAWA, T.; YAMAMOTO, Y. et al. Enhanced antitumor potency of polyethylene glycolylated tumor necrosis factor- $\alpha$ : a novel polymer-conjugation technique with a reversible amino-protective reagent. **J Pharmacol Exp Ther.** 290:368-372, 1999

VITALE, G.; VAN EIJCK, C. H. J.; VAN KOETSVELD, P.M. ET AL. Type I Interferons in the Treatment of Pancreatic Cancer Mechanisms of Action and Role of Related Receptors. **Annals of Surgery.** V. 246, N. 2, 2007

- WANG, Y.S.; YOUNGSTER, S.; BAUSCH, J.; ZHANG, R.; MCNEMAR, C.; WYSS, D.F. Identification of the major positional isomer of pegylated interferon alpha-2b. **Biochemistry**. 39:10634–10640, 2000
- WEERD, N.; SAMARAJIWA, S. A.; HERTZOG, P. J. Type I Interferon Receptors: Biochemistry and Biological Functions. **J. Biol. Chem.** 2007, May 14, 2007
- XINMING SU, JIAN YE, EDDY C. HSUEH, YANPING ZHANG, DANIEL F. HOFT AND GUANGYONG PENG. Tumor Microenvironments Direct the Recruitment and Expansion of Human Th17 Cells. **J Immunol**. 184 (3) 1630-1641, 2010
- YAN, N.; CHEN, Z. J. Intrinsic antiviral immunity. **Nature Immunol**. 13, 214–222, 2012
- YU, Q.; LOU, X.M.; HE, Y. Prediction of local recurrence in cervical cancer by a Cox model comprised of lymph node status, lymph-vascular space invasion, and intratumoral Th17 cell-infiltration. **Med Oncol**. 31: 795, 2014
- ZACHARIAE H, LARSEN PM, SOGAARD H. Recombinant interferon alpha-2A (Roferon-A) in a case of Buschke-Löwenstein giant condyloma. **Dermatologica**. 177(3):175-9, 1988
- ZHANG, J.P.; YAN, J.; XU, J.; PANG, X.H.; CHEN, M.S.; LI, L. et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. **J Hepatol**. 50: 980–989, 2009
- ZHANG, K.; MATSUI, Y.; HADASCHIK, B. A.; LEE, C.; JIA, W. et al. Down-regulation of type I interferon receptor sensitizes bladder cancer cells to vesicular stomatitis virus-induced cell death. **International Journal of cancer**. V. 127, N. 4, P. 830–838, 2010
- ZHANG, K.; MATSUI, Y.; HADASCHIK, B. A.; LEE, C. et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. **N Engl J Med**. 348:203-213, 2003
- ZHOU, L.; CHONG, M.M.; LITTMAN, D.R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. **Immunity** 30, 646–655, 2009
- ZIMMERER, J. M.; LESINSKI, G. B.; RUPPERT, A. S.; RADMACHER, M. D.; NOBLE, C.; KENDRA, K.; WALKER, M. J.; CARSON, W. E. Gene Expression Profiling Reveals Similarities between the In vitro and In vivo Responses of Immune Effector Cells to IFN- $\alpha$ . **Clin Cancer Res**. V.14, N. 18, 2008

## ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



4/4

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP

## Parecer Substanciado

PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

## IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CLÍNICA E DO SORO SANGUÍNEO DE PACIENTES COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL DE ALTO GRAU TRATADAS COM INTERFERON PEGULADO

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Eddie Fernando Cláudio Murta

INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM

DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 19-11-2009

PROTOCOLO CEP/UFTM: 1525

anticorpo anti-IFN- $\beta$ PE	1: 1.000,00
Interferon pegulado $\alpha$ -2a (ampolas)	180: 30.600,00
seringa de 1,0ml (caixa com 100)	3: 60,00
<b>TOTAL</b>	<b>48.660,00</b>

O Projeto será financiado pela Fapemig. O orientador possui verba bancada para o projeto. O laboratório e o ambulatório no qual será realizado o projeto possuem materiais permanentes.

## 12. FORMA E VALOR DA REMUNERAÇÃO DO PESQUISADOR

Salário de professor da UFTM.

## 13. ADEQUAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO E FORMA DE OBTÊ-LO

O consentimento livre e esclarecido será obtido quando da coleta pelo profissional responsável por esta.

14. ESTRUTURA DO PROTOCOLO – O protocolo está adequado para atender às determinações da Resolução CNS 196/96.

## 15. COMENTÁRIOS DO RELATOR, FRENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E COMPLEMENTARES

PARECER DO CEP: APROVADO

(O relatório anual ou final deverá ser encaminhado um ano após o início do processo).

DATA DA REUNIÃO: 09-07-2010

Prof. Ana Edmira Soares dos Santos  
Coordenadora

**ANEXO B: MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****TERMO DE ESCLARECIMENTO**

A senhora possui uma alteração no colo do útero chamada Neoplasia Intraepitelial Cervical e está sendo convidada a participar de um estudo sobre a resposta imune frente à infecção pelo HPV, o vírus responsável por esta alteração. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este. Por esse motivo, sua participação é muito importante. O objetivo deste estudo é avaliar as vias de ativação do sistema imune e caso participe, será necessária uma coleta sangue. Não será feito nenhum procedimento que lhe traga qualquer risco à sua vida, mas poderá acontecer algum desconforto no momento da coleta de sangue.

A senhora poderá obter todas as informações que quiser, estando livre para abandonar sua participação desta pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo ao seu atendimento. Pela sua participação no estudo, não haverá pagamento de qualquer valor em dinheiro, mas a senhora terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização desta pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não será citado em qualquer momento do estudo, pois a identificação será através de números.



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi a utilidade do 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/Responsável legal

\_\_\_\_\_  
Documento de identidade

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável  
Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

**Telefone de contato dos pesquisadores:**

Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON): (34)3318-5595

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.