



**Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

**Fabiano Vilela Mundim**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS NA SECREÇÃO  
ENDOCERVICAL DE PACIENTES COM NIC II E III TRATADAS  
COM INTERFERON ALFA PEGUILADO**

**Uberaba-MG**

**2017**

Fabiano Vilela Mundim

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS NA SECREÇÃO  
ENDOCERVICAL DE PACIENTES COM NIC II E III TRATADAS  
COM INTERFERON ALFA PEGUILADO

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

**Orientador:** Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta  
**Co-orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Antoniazi Michelin

Uberaba-MG

2017

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

M928a Mundim, Fabiano Vilela  
Avaliação do perfil de citocinas na secreção endocervical de  
pacientes com NIC II e III tratadas com interferon alfa peguilado /  
Fabiano Vilela Mundim. -- 2017.  
125 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universida-  
de Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017  
Orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta  
Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazzi Michelin

1. Imunoterapia. 2. Citocinas. 3. Interferon  $\alpha$  2b peguilado.  
4. Neoplasia intraepitelial cervical. I. Murta, Eddie Fernando  
Candido. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 612.07

*“Dedico este trabalho primeiramente a Deus, e Nossa Senhora da Abadia grandes fontes de força e inspiração. À minha família; esposa, filhos, pais, irmãos e aos mestres e colegas pelo incentivo e apoio nesta caminhada”*

## AGRADECIMENTOS

Agradecer, reconhecer, gratificar .....,

Poderia apenas falar um “**MUITO OBRIGADO !!!**”, e ficar em minhas lembranças todas aquelas pessoas que contribuíram para este trabalho.

Então dessa maneira, gostaria de deixar aqui os meus **mais sinceros agradecimentos** a todos aqueles que me ajudaram nessa caminhada:

Agradeço a meus Mestres, Dr<sup>o</sup> Eddie Fernando Candido Murta e Prof<sup>a</sup> Márcia Antoniazzi Michelin pela oportunidade, conhecimentos, apoio, amizade e compreensão para o andamento deste trabalho.

À minha esposa Ana Carolyna, obrigado pela dedicação, incentivo, companheirismo e por acreditar sempre em mim, me incentivando nos momentos difíceis.

Aos meus filhos: Bruno, Inácio e Heitor, obrigado pela compreensão da correria e abdicação das brincadeiras e lazer.

Aos meus Pais: Valério e Horacilda (exemplos de sabedoria e carinho), meus irmãos Daniela e Luciano – eterna cumplicidade ..... Muito Obrigado!!!

Meu agradecimento também a Prof<sup>a</sup> Edna Valim, Andreia e Prof<sup>o</sup> Cláudio Simon pela ajuda e colaboração nesse estudo.

Aos meus colegas e companheiros do Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) que estiveram comigo: Eduardo, Leticia, Alessandra, Cláudio, Andjara, Saulo, Carolina, Poliana, Jéssica, Renata, Angela, Larissa, Tauana, Ananda, Isabela, Millena, Douglas, Thiago, Chamberttan, Bruno, André, Rafael, ....., e ao Dr. Marco Aurélio Trovó pelo auxílio na coleta das amostras para este trabalho; **Muito Obrigado!!!** por contribuírem e colaborarem de alguma forma com meus conhecimentos.

- UFTM e FAPEMIG – Obrigado pelo espaço e apoio financeiro.

*“Do Senhor é a terra e tudo o que ela contém,  
A órbita terrestre e todos os que nela habitam.  
Pois ele mesmo a assentou sôbre as águas do  
mar e sobre as águas dos rios a consolidou”*

*Davi (HEBR.24)*

## RESUMO

A neoplasia intraepitelial cervical como consequência da transformação carcinogênica causada pelo HPV é hoje um dos principais fatores de intercorrências no aparelho genital feminino. Além do câncer invasivo do colo uterino; intervenções do tratamento, como conização e LEEP podem levar a complicações obstétricas, com consequente infertilidade. Avanços na compreensão do sistema imune têm levado a novas estratégias de tratamento. As citocinas são um grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante as respostas imunes, e entre elas, o interferon possui papel imprescindível nos mecanismos de proteção antiviral, exercendo potentes efeitos imunomodulatórios e no controle do crescimento celular. Estimular o sistema imunológico a reconhecer células modificadas ou infectadas tem sido um grande desafio. Dessa maneira, foi avaliada a resposta imune local nas secreções de pacientes com lesões neoplásicas de alto grau tratadas com IFN- $\alpha$  2b peguilado. Para tanto, foi realizada uma terapia com seis doses da medicação (Interferon  $\alpha$  2b peguilado) em 16 pacientes diagnosticadas com lesão de alto grau; e em cada aplicação do tratamento, durante a inspeção especular foram coletadas amostras das secreções para dosagem de citocinas (IL-2, IL-12, TNF, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10) por ensaio imunoenzimático (ELISA). Como metodologia do estudo, as pacientes foram divididas em três grupos, (Geral, Boa e Má respostas) baseadas nos resultados das biópsias coletadas durante o tratamento; antes da terapia (1ª aplicação) e após o tratamento (6ª aplicação). Para a avaliação dos resultados utilizou-se os testes estatísticos de Friedman e Mann-Whitney considerando-se a amostragem significativa quando  $p \leq 0,05$ . Diante dos resultados obtidos, verificou-se que 43,75% das pacientes obtiveram resposta clínica satisfatória. Na avaliação das citocinas, foram observadas grandes variações durante a terapia, com alterações significativas durante todo o tratamento e entre os períodos de aplicações, das quais podemos destacar o TGF- $\beta$  (Grupo geral), com diminuição significativa durante o tratamento com todas as pacientes ( $p=0,035$ ), e entre a 1ª e 4ª e 4ª e 5ª aplicações ( $p=0,0420/p=0,0285$ ). A citocina TNF- $\alpha$  no grupo de pacientes com Boa resposta à terapia apresentou o mesmo perfil de diminuição estatisticamente relevante

( $p=0,011/p=0,070/p=0,0379$ ) durante os períodos de aplicação (1ª e 6ª, 2ª e 6ª e 4ª e 6ª aplicações), com tendência a manter esse aspecto no término da terapia. Na análise da IL-4 entre no grupo de pacientes com Má resposta, foram verificados resultados significantes ( $p=0,018/p=0,0258$ ) com uma diminuição durante as aplicações (1ª e 5ª e 1ª e 6ª aplicações). Além disso, observou-se também que essa citocina apresentou dados significantes na 1ª aplicação quando comparados os dois grupos de pacientes (Boa e Má respostas) durante os períodos da terapia ( $p=0,0229$ ). Esses dados nos permitem concluir que o perfil predominante naquelas pacientes que tiveram falha na terapia parece estar associado com níveis aumentados da IL-4, no início do tratamento; e que ainda uma diminuição do TGF- $\beta$  e do TNF- $\alpha$  podem estar relacionados com aquelas pacientes que responderam ao tratamento. Contudo, de uma maneira geral, a imunoterapia com IFN  $\alpha$ -2b peguilado mostrou-se satisfatória quando comparamos com outros trabalhos similares na literatura, sugerindo que esse tratamento possa ser uma opção terapêutica no futuro, principalmente para mulheres jovens, onde tratamentos agressivos das neoplasias e suas complicações possam ser evitados.

**Palavras-chave:** Citocinas, Interferon  $\alpha$  2b peguilado, imunoterapia, neoplasia intraepitelial cervical.

## ABSTRACT

Cervical intraepithelial neoplasia as a consequence of the carcinogenic transformation caused by HPV is now one of the main intercurrent factors in the female genital tract. In addition to invasive cervical cancer; interventions such as conization and LEEP can lead to obstetric complications, with consequent infertility. Advances in understanding the immune system have led to new treatment strategies. Cytokines are a group of molecules involved in the emission of signals between cells during immune responses, and among them, interferon plays an essential role in antiviral protection mechanisms, exerting potent immunomodulatory effects and in controlling cell growth. Stimulating the immune system to recognize modified or infected cells has been a major challenge. In this way, the local immune response in the secretions of patients with high grade neoplastic lesions treated with pegylated IFN- $\alpha$  2b was evaluated. A six-dose therapy (Interferon  $\alpha$  2b pegylated) was performed in 16 patients diagnosed with high-grade lesions; (IL-2, IL-12, TNF, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10) were collected during the specular inspection by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). As a study methodology, the patients were divided into three groups (General, Good and Bad responses) based on the results of the biopsies collected during the treatment; before therapy (1st application) and after treatment (6th application). The Friedman and Mann-Whitney statistical tests were used for the evaluation of the results, considering the significant sampling when  $p \leq 0.05$ . In view of the results obtained, it was verified that 43.75% of the patients had a satisfactory clinical response. In the evaluation of cytokines, large variations were observed during therapy, with significant changes throughout the treatment and between the application periods, of which we can highlight the TGF- $\beta$  (General group), with a significant decrease during the treatment with all patients ( $P = 0.035$ ), and between the 1st and 4th and 4th and 5th applications ( $p = 0.0420$  /  $p = 0.0285$ ). The cytokine TNF- $\alpha$  in the group of patients with good response to therapy had the same statistically significant reduction profile ( $p = 0.011$  /  $p = 0.070$  /  $p = 0.0379$ ) during the application periods (1st and 6th, 2nd and 6th and 4th and 6th applications), tending to maintain this aspect at the end of therapy. In the analysis of IL-4 among the group of patients with poor response, significant

results ( $p = 0.018$  /  $p = 0.0258$ ) were observed with a decrease during the applications (1st and 5th and 1st and 6th applications). In addition, it was also observed that this cytokine presented significant data in the 1st application when comparing the two groups of patients (Good and Bad responses) during the periods of therapy ( $p = 0.0229$ ). These data allow us to conclude that the predominant profile in those patients who failed therapy appears to be associated with increased levels of IL-4 at the start of treatment; and that even a decrease in TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  may be related to those patients who responded to treatment. However, immunotherapy with pegylated IFN $\alpha$ -2b has been shown to be satisfactory when compared to other similar studies in the literature, suggesting that this treatment may be a therapeutic option in the future, especially for young women, where aggressive treatment of neoplasias and its complications can be avoided.

**Keywords:** Cytokines, Interferon  $\alpha$  2b pegylated, immunotherapy, cervical intraepithelial neoplasia

## LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Genoma HPV16, esquema representativo .....	<b>6</b>
<b>Figura 2</b> – Epitélio estratificado infectado pelo HPV .....	<b>8</b>
<b>Figura 3</b> – Mecanismo do desenvolvimento do câncer cervical.....	<b>10</b>
<b>Figura 4</b> - Multiprocesso da carcinogênese pelo HPV .....	<b>14</b>
<b>Figura 5</b> – Perfis da resposta imune na diferenciação de células TCD4 <sup>+</sup> .....	<b>18</b>
<b>Figura 6</b> – Imunidade das células TCD4 <sup>+</sup> contra HPV16 .....	<b>21</b>
<b>Figura 7</b> – Vias de sinalização do interferon .....	<b>24</b>
<b>Figura 8</b> – Coleta da secreção endocervical.....	<b>35</b>
<b>Figura 9</b> – Diluição da solução padrão.....	<b>37</b>
<b>Figura 10</b> – Disposições do experimento na placa de ELISA.....	<b>38</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Gráfico da análise da concentração Geral da citocina IL-2 em amostras de secreção endocervical ..... **47**
- Gráfico 2** – Gráficos das concentrações de IL-2 em amostras de secreção endocervical das pacientes com Boa e Mé respostas..... **48**
- Gráfico 3** – Gráfico das médias, regressão linear e tendência da IL-2 durante as aplicações de interferon alfa 2B peguilado nos grupos de pacientes com Boa e Má resposta ao tratamento..... **49**
- Gráfico 4** - Gráfico da análise da concentração Geral da citocina IL-12 em amostras de secreção endocervical ..... **50**
- Gráfico 5** – Gráficos das concentrações de IL-12 em amostras de secreção endocervical das pacientes com Boa e Má respostas..... **50**
- Gráfico 6** - Gráfico das médias, regressão linear e tendência da IL-12 durante as aplicações de interferon alfa 2B peguilado nos grupos de pacientes com Boa e Má resposta ao tratamento..... **51**
- Gráfico 7** - Gráfico da análise da concentração Geral da citocina IL-10 em amostras de secreção endocervical ..... **52**
- Gráfico 8** – Gráficos das concentrações de IL-10 em amostras de secreção endocervical, das pacientes com Boa e Má respostas..... **52**
- Gráfico 9** – Gráfico das médias, regressão linear e tendência da IL-10 durante as aplicações de interferon alfa 2B peguilado nos grupos de pacientes com Boa e Má resposta ao tratamento..... **53**
- Gráfico 10** – Gráfico da análise da concentração Geral da citocina IFN- $\gamma$  em amostras de secreção endocervica ..... **54**
- Gráfico 11** – Gráficos das concentrações de IFN- $\gamma$  em amostras de secreção endocervical das pacientes com Boa e Mé respostas..... **54**

<b>Gráfico 12</b> – Gráfico das médias, regressão linear e tendência da $IFN-\gamma$ durante as aplicações de interferon alfa 2B peguilado nos grupos de pacientes com Boa e Má resposta ao tratamento .....	<b>55</b>
<b>Gráfico 13</b> – Gráfico da análise da concentração Geral da citocina $TNF-\alpha$ em amostras de secreção endocervical .....	<b>56</b>
<b>Gráfico 14</b> – Gráficos das concentrações de $TNF-\alpha$ em amostras de secreção endocervical, das pacientes com Boa e Má respostas.....	<b>56</b>
<b>Gráfico 15</b> – Gráfico das médias, regressão linear e tendência da $TNF-\alpha$ durante as aplicações de interferon alfa 2B peguilado nos grupos de pacientes com Boa e Má resposta ao tratamento .....	<b>57</b>
<b>Gráfico 16</b> – Gráfico da análise da concentração Geral da citocina $TGF-\beta$ em amostras de secreção endocervical .....	<b>58</b>
<b>Gráfico 17</b> - Gráficos das concentrações de $TGF-\beta$ em amostras de secreção endocervical, das pacientes com Boa e Má respostas.....	<b>58</b>
<b>Gráfico 18</b> - Gráfico das médias, regressão linear e tendência da $TGF-\beta$ durante as aplicações de interferon alfa 2B peguilado nos grupos de pacientes com Boa e Má resposta ao tratamento. ....	<b>59</b>
<b>Gráfico 19</b> - Gráfico da análise da concentração Geral da citocina de $IL-4$ em amostras de secreção endocervical .....	<b>60</b>
<b>Gráfico 20</b> - Gráficos das concentrações de $IL-4$ em amostras de secreção endocervical, das pacientes com Boa e Má respostas.....	<b>60</b>
<b>Gráfico 21</b> - Gráfico das médias, regressão linear e tendência de $IL-4$ durante as aplicações de interferon alfa2b peguilado nos grupos de pacientes com Boa e Má resposta ao tratamento.....	<b>61</b>
<b>Gráfico 22</b> - Gráfico da análise das concentrações de $IL-4$ , comparadas entre os grupos Boa e Má resposta durante os períodos de tratamento.....	<b>62</b>
<b>Gráfico 23</b> - Gráfico da análise da concentração Geral da citocina de $IL-6$ em amostras de secreção endocervical .....	<b>63</b>

**Gráfico 24** - Gráfico das concentrações de IL-6 em amostras de secreção endocervical, das pacientes com Boa e Má respostas..... **63**

**Gráfico 25** - Gráfico das médias, regressão linear e tendência da IL-6 durante as aplicações de interferon alfa 2B peguilado nos grupos de pacientes com Boa e Má resposta ao tratamento..... **64**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de colo de útero .....	<b>15</b>
<b>Tabela 2</b> – Resumo das principais citocinas produzidas pelo sistema imune, suas fontes, ações pleiotrópicas e receptores.....	<b>19</b>
<b>Tabela 3</b> - A família dos interferons e suas principais características.....	<b>22</b>
<b>Tabela 4</b> – Metodologia dos grupos de estudo .....	<b>39</b>
<b>Tabela 5</b> – Características gerais do estilo de vida e fatores de riscos convencionais dos grupos de estudo .....	<b>43</b>
<b>Tabela 6</b> - Características das pacientes que tiveram Boa resposta terapêutica ao tratamento com interferon alfa 2b peguilado .....	<b>43</b>
<b>Tabela 7</b> - Característica das pacientes que tiveram Má resposta terapêutica ao tratamento com interferon alfa 2b peguilado .....	<b>44</b>

## LISTA DE PRANCHAS

**Prancha 1** - *Imagens colposcópicas de Boa resposta terapêutica colhidas da Paciente 2 durante no início e término do tratamento com interferon alfa 2b peguilado..... 45*

**Prancha 2** - *Imagens colposcópicas de Boa resposta terapêutica colhidas da Paciente 16 durante no início e término do tratamento com interferon alfa 2b peguilado..... 45*

**Prancha 3** - *Imagens colposcópicas de Má resposta terapêutica colhidas da Paciente 5 durante no início e término do tratamento com interferon alfa 2b peguilado..... 46*

**Prancha 4** - *Imagens colposcópicas de Má resposta terapêutica colhidas da Paciente 8 durante no início e termino do tratamento com interferon alfa 2b peguilado..... 46*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

% - Porcento

$\mu\text{L}$  - Microlitro

**Act RII** - Receptor de Activina tipo II

**Act RIIB** - Receptor de Activina tipo 2B

**ALk** - Tyrosine kinase receptor

**APCs** - células apresentadores de antígeno

**BMP RII** - Receptor de proteína morfogenética do osso tipo II (cinase receptora serina/treonina)

**CC** - Câncer cervical

**CD4** - Cluster of differentiation 4

**CD8** - Cluster of differentiation 8

**DCs** - Células dendríticas

**FOXP3** - Forkhead Transcription Factor

**GATA-3** – Fator de transcrição “trans” codificado pelo gene gata 3

**gp130** - Receptor de citocina da classe de receptores de citocina tipo I da IL-6

**HLA** - Antígeno Leucocitário Humano

**HPV** - Papilomavírus humano

**HSIL** - Lesão intraepitelial de Alto Grau

**HSIL** - Lesão intraepitelial de Alto Grau

**IFNAR 1** - Receptor 1 de ativação de interferon

**IFNAR 2** - Receptor 2 de ativação de interferon

**IFNGR1** - Receptor alfa do interferon gama, denominado também CD119

**IFNGR2** - Receptor beta do interferon gama

**IFN-TI** - Interferons do Tipo I

**IFN-TII** - Interferons do Tipo II

**IFN-TIII** - Interferons do Tipo III

**IFN- $\gamma$**  - Interferon gama

**IL** - Interleucina

**IL-10** - Interleucina 10

**IL-10R1** - Receptor 1 para a interleucina 10, denominado também CD210

**IL-10R2** - Receptor 2 para a interleucina 10, denominado também CD 210B

**IL-12** - Interleucina 12

**IL-12R $\beta$ 1** - Receptor beta 1 para a interleucina 12, denominado também CD 212

**IL-12R $\beta$ 2** - Receptor beta 2 para a interleucina 12

**IL-2** - Interleucina 2

**IL-2R $\alpha$**  - Receptor alfa para a interleucina 2

**IL-2R $\alpha$**  = Receptor alfa da interleucina 2, denominado também CD25

**IL-2R $\beta$**  - Receptor beta para interleucina 2

**IL-2R $\beta$**  = Receptor beta da interleucina 2, denominado também CD122

**IL-4** - Interleucina 4

**IL-4R $\alpha$**  - Receptor alfa da interleucina 4, denominado também CD124

**IL-6** - Interleucina 6

**IL-6R $\alpha$**  - Receptor alfa da interleucina 6, denominado também CD 126

**INCA** - Instituto Nacional do Câncer

**IPON** - Instituto de Pesquisa em Oncologia

**iTREG** - The regulatory T cells

**Jak** - Janus quinase

**LSIL** - Lesão intraepitelial de Baixo Grau

**MHC/CHP** - Complexo principal de histocompatibilidade

**Mis** - Müllerian Inhibiting Substance Type II Receptor

**MIS RII** - Receptor de Inibidores da substância Mülleriana/Receptor de Hormônio anti-Mülleriana

**mL** - Mililitro (s)

**mRNA** - Ácido ribonucléico mensageiro

**NaCl** - cloreto de sódio

**NIC** - Neoplasia Intraepitelial Cervical

**NK** - Células Natural Killer

**°C** - Grau Celsius

**PAMPS** - Padrões Moleculares Associados à Patógenos

**PCR** - Reação em cadeia da polimerase

**ROR $\gamma$**  - Fator de transcrição codificado pelo gene RORC

**SI** - Sistema Imune

**STAT** - Família de proteínas de transcrição intracelulares

**Tbet** - Fator de transcrição T-box codificado pelo gene TBX21

**TCR** - Receptor de Células T

**TGF- $\beta$**  - Fator de transformação do crescimento beta

**TGF- $\beta$ R2** - Receptor beta 2 para o Fator de transformação do crescimento beta

**TH1** - Subtipo de linfócito T helper auxiliar do perfil 1

**TH2** - Subtipo de linfócito T helper auxiliar do perfil 2

**TNFRSF1** - Receptor para TNFSF2 / TNF-alfa e TNFSF1 homotrimétrico / linfotóxina alfa. Denominado também CD120a

**TNFRSF2** - Receptor 2 para TNF-alfa, denominado também CD 120b

**TNF- $\alpha$**  - Fator de Necrose Tumoral (TNF, Fator de Necrose tumoral alfa, TNFa, cachexina, ou caquetina).

**Tyk** - Tirosina quinase

**UFTM** - Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**WHO** - World Health Organization

**$\alpha$**  - Alfa

**$\beta$**  - Beta

**$\gamma$**  - Gama

**$\gamma$ c** - Receptor comum da cadeia gama, denominado também CD132.

## SUMÁRIO

**AGRADECIMENTOS**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES**

**LISTA DE TABELAS**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**LISTA DE SIGLAS**

**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1 – Aspectos epidemiológicos do câncer de colo do útero e a infecção pelo papilomavírus humano .....	<b>02</b>
2.0 – Ciclo biológico do HPV e o papel das proteínas virais .....	<b>04</b>
2.1 – Papiloma vírus humano .....	<b>04</b>
2.2 – O papel das proteínas virais .....	<b>07</b>
3.0 – Classificação das Neoplasias Intraepiteliais e o câncer de colo de útero.....	<b>11</b>
3.1 – Neoplasia Intraepitelial Cervical.....	<b>11</b>
3.2 – Câncer de colo de útero e fatores de risco .....	<b>13</b>
3.3 – Resposta imune ao tumor e o papel das citocinas.....	<b>16</b>
3.4 – O uso do interferon nas imunoterapias .....	<b>21</b>
<b>4. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>27</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>6. CASUÍSTICA &amp; MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
6.1 – Casuística .....	<b>31</b>
6.2 – Métodos .....	<b>33</b>
6.2.1 – Aplicação do interferon .....	<b>33</b>
6.2.2 – Coleta da secreção endocervical .....	<b>34</b>
6.2.3 – Quantificação das citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA) .....	<b>35</b>
6.2.4 – Metodologia para a dosagens das citocinas .....	<b>36</b>
6.2.5 – Análise estatística .....	<b>39</b>
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
7.1 – Resultados do Tratamento.....	<b>42</b>

7.2 – Resultado da videocolposcopia das pacientes estudadas.....	45
7.3 – Avaliação das citocinas nas secreções endocervicais.....	47
<b>8. DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>9. CONCLUSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>97 – 106</b>

# ***1-Introdução***

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Aspectos epidemiológicos do câncer de colo do útero e a infecção pelo papilomavírus humano

Caracterizado por possuir capacidades biológicas como marcas essenciais de atividades complexas, onde reúne sinalização proliferativa, evasão e metástase como assinaturas específicas; o câncer de colo de útero ou cervical (CC) é uma doença que acomete milhões de pessoas em todo o mundo (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o CC (câncer cervical) configura entre as principais causas de morbidade e mortalidade, sendo responsável por quase 12% de todos os cânceres femininos e 7.5% das mortes (FERLAY et al., 2015). Estatísticas globais do ano de 2013 demonstraram que 485.000 mulheres foram diagnosticadas com esta doença, sendo constatado um total de 236.000 mortes (FITZMAURICE et al., 2015).

Essa elevada taxa de incidência e mortes deve-se, em grande parte, a países menos desenvolvidos do mundo onde programas de saúde são muitas vezes negligenciados por falta de estruturas básicas e serviços de proteção ao CC, como a África, onde o câncer cervical é o segundo câncer com maior frequência (21%) e a principal causa de morte entre mulheres africanas por câncer (19%) (DE VUYST et al., 2013; JEMAL et al., 2012; LOUIE et al., 2009).

No Brasil o câncer cervical é classificado como quarta causa de mortes e a segunda causa de câncer feminino em idades entre 15 a 44 anos (HPV; CENTRE, 2016), com uma incidência, segundo dados estatísticos do INCA, para o ano de 2016 de 16.340 novos casos (15,85 / 100.000 mulheres), sendo que a região Norte do país figura como a área que possui a maior ocorrência e mortalidade.

Esta neoplasia possui características multifatoriais que ao longo dos anos foi demonstrado por diversas metodologias de pesquisas que o papilomavírus humano (HPV) é seu agente etiológico sexualmente transmissível bem estabelecido

e necessário, mas não suficiente para o desenvolvimento da carcinogênese (BOSCH et al., 1995; DAS et al., 2000; SCHIFFMAN; CASTLE, 2003; WALBOOMERS et al., 1999).

A infecção causada pelo papilomavírus humano (HPV) é uma das causas essenciais e necessárias na etiopatogênese do câncer de colo do útero, bem como de suas lesões precursoras, as Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NICs) (BOSCH; QIAO; CASTELLSAGUÉ, 2006; FRANCO; ROHAN; VILLA, 1999; GHITTONI et al., 2015; MASSIMO TOMMASINO, 2014; MENDES; JOSÉ; LEVI, 2016; ROSA et al., 2009; SCHIFFMAN MH, 2003).

Os casos de câncer relacionados diretamente com a infecção pelo vírus HPV são em média global 4,8% (FORMAN et al., 2012), mas no Brasil, no entanto, vários estudos têm demonstrado que esta prevalência é alta, podendo variar entre 21% a 48% e o vírus está diretamente relacionado com lesões de alto grau e câncer cervical, sendo encontrado ainda em muitos estudos pacientes jovens e sexualmente ativas (AYRES; SILVA, 2010; FEDRIZZI, 2011; RAMA et al., 2008).

Outro panorama assustador da infecção pelo HPV pode ser observado na Índia, onde a prevalência viral da infecção pelo HPV é maior que 90% em alguns estudos epidemiológicos (KULKARNI et al., 2011; PILLAI et al., 2010).

Em vários trabalhos descritivos e epidemiológicos têm sido observado a alta incidência da infecção por HPV em mulheres jovens, no início da atividade sexual, onde estima-se uma prevalência cumulativa na ordem de 82% entre adolescentes, sendo que quase todas são sexualmente ativas e possuindo alto risco de adquirir o HPV (LORENZI; SYRJÄNEN; LONGATTO-FILHO, 2015; PINTO; BARBOSA; PAIVA, 2012; SMITH; PH, 2008). Para Palefsky (2001), mais de 70% das adolescentes sexualmente ativos ou adultos, entre as idades de 15 e 49 anos irão contrair pelo menos um tipo de infecção por HPV durante a sua vida.

Um estudo realizado por Ayres constatou que a presença do vírus é frequente entre mulheres brasileiras, inclusive entre aquelas com citologia normal, sendo que a prevalência geral de infecção pelo HPV pode variar entre 13,7% e

54,3%, e para as mulheres com citologia normal, entre 10,4% e 24,5%, dados estes elevados quando comparados com uma estimativa global de 11,7% ou 24% e 21,4% em regiões como a África e Europa Oriental, como observado por Bruni e colaboradores analisando achados citológicos normais de mais de 1 milhão de mulheres em todo o mundo.

Nas últimas décadas vários estudos epidemiológicos de impacto e custo para prevenção do câncer foram realizados em diversas regiões do mundo para avaliar estratégias de prevenção do CC (BERKHOF et al., 2013; KIM et al., 2013; SANKARANARAYANAN et al., 2013; SEOUD et al., 2013; VACCARELLA; BRUNI; SEOUD, 2013), com a utilização de novas técnicas de triagens, imunização e abordagens alternativas de rastreamento, para diminuir a incidência e mortalidade do CC (ADEFUYE et al., 2013; FRANCO; COUtlÉE; FERENCZY, 2009; HUCHKO et al., 2015; SANKARANARAYANAN et al., 2013).

Estudos epidemiológicos são indispensáveis para a construção de indicadores de saúde, como a infecção pelo HPV e o câncer de colo de útero, pois a partir desses dados, estratégias e programas permanentes possam ser desenvolvidos no Brasil e no mundo principalmente no que diz respeito a exames preventivos e periódicos nos grupos de maior vulnerabilidade.

## **2 - O ciclo biológico do HPV e o papel das proteínas virais**

### **2.1 Papiloma vírus humano**

O conhecimento e achados sobre o HPV datam relatos de séculos passados desde a antiguidade por Hipócrates (SYRJÄNEN; SYRJÄNEN, 2008), mas somente no século XX, foi que a ciência e a tecnologia desenvolveram métodos e instrumentos que permitiram identificar e caracterizar esses patógenos, bem como suas capacidades de infecção, reprodução e transmissão de uma célula hospedeira para outra, por mecanismos bastante diversificados (CAMARA et al., 2008).

O papiloma vírus pertence à família *Papillomaviridae* - gênero Papilomavírus que podem infectar os seres humanos e um grande número de espécies animais (coelhos, gatos e primatas não humanos), tendo tropismo específico para epitélio estratificado da pele ou mucosa do hospedeiro onde dependem de sequestro e manipulação de fatores do hospedeiro para manter seu estilo de vida (MCBRIDE; JANG, 2013).

Na década de 1970 foram isolados tipos específicos do papilomavírus humano em biópsias de câncer cervical abrindo caminho para estudos detalhados do papel desses vírus nos cânceres genitais, e propondo a hipótese de que os HPVs eram sexualmente transmissíveis e participavam diretamente como causa central e necessária para a evolução do CC, sendo descrito uma grande diversidade dessa classe viral (LETO et al., 2011; ZUR HAUSEN, 2000).

Dados apontam a existência de mais 200 tipos de Papiloma Vírus descritos nas últimas décadas, que se distinguem entre si na sequência do DNA. Desse total 100 tipos são importantes patógenos humanos, dos quais mais de 40 subtipos infectam a região anogenital, sendo 15 considerados carcinogênicos para o epitélio cervical uterino e classificados como tipos "certo de risco oncogênico" (HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), e outros 3 foram classificados como tipos de "provável alto risco oncogênico" (HPVs 26, 53 e 66) (BERNARD, 2005; BERNARD et al., 2010; FORMAN et al., 2012; MUNOZ et al., 2003; VILLIERS et al., 2004).

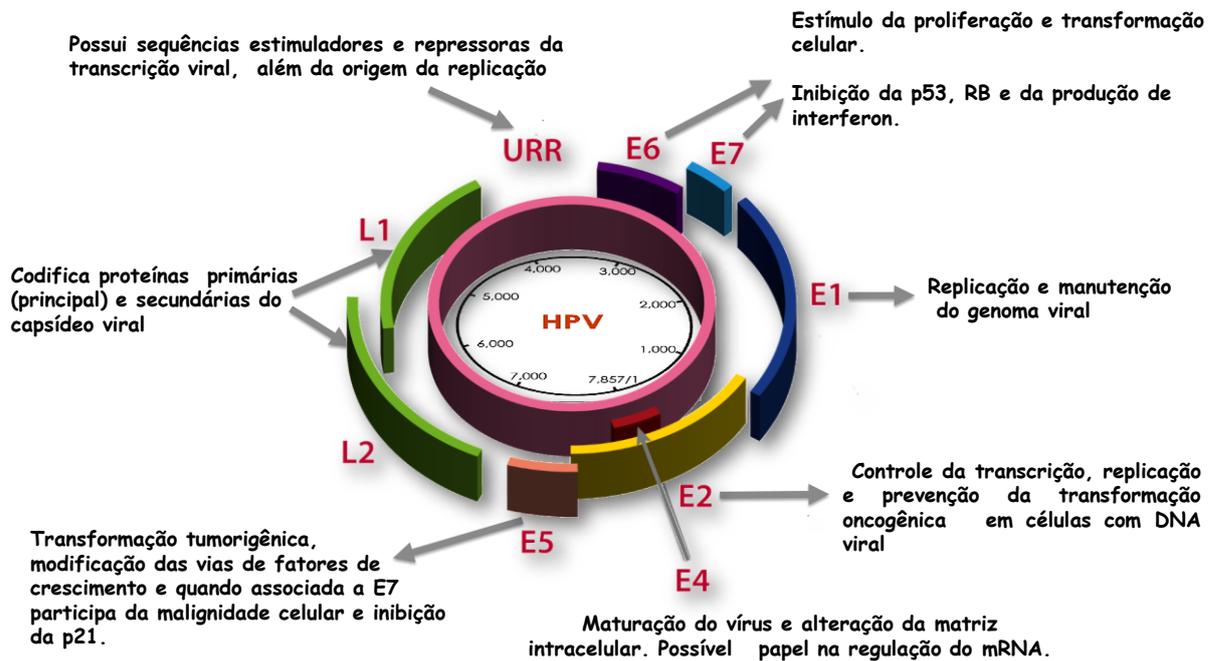
Os HPVs tipos 6 e 11, de "baixo risco oncogênico", são detectáveis em mais de 90% das verrugas genitais do sexo masculino e em uma parcela dos casos de neoplasia intraepitelial de baixo grau do colo uterino e vulva, desempenhando um papel importante no desenvolvimento da doença, com maior incidência e menor tempo para detecção entre os homens com infecção pelo vírus (ANIC et al., 2011; POTOČNIK et al., 2007).

O HPV é um vírus pequeno (50-55 nm), não envelopado, com forma icosaédrica; possuindo DNA de cadeia dupla com aproximadamente 8000 pares de

bases nitrogenadas e oito regiões ORFs conhecidas como fass de leitura aberta (open reading frames) (VILLIERS et al., 2004).

Sua biologia molecular é bastante complexa, tendo seu genoma dividido em três regiões: aquela que codifica as proteínas individuais e tardias (L), composta por L1 e L2 para criação de novos vírus importantes nas infecções, a região reguladora (LCR), que contém intensificadores e promotores de transcrição essenciais durante a replicação viral, e a região (E) que é composta por sete genes (E1-E7) necessários à multiplicação e com propriedades de transformação oncogênica (MCBRIDE; JANG, 2013; PRETET; CHARLOT; MOUGIN, 2007) –

**Figura 1.**



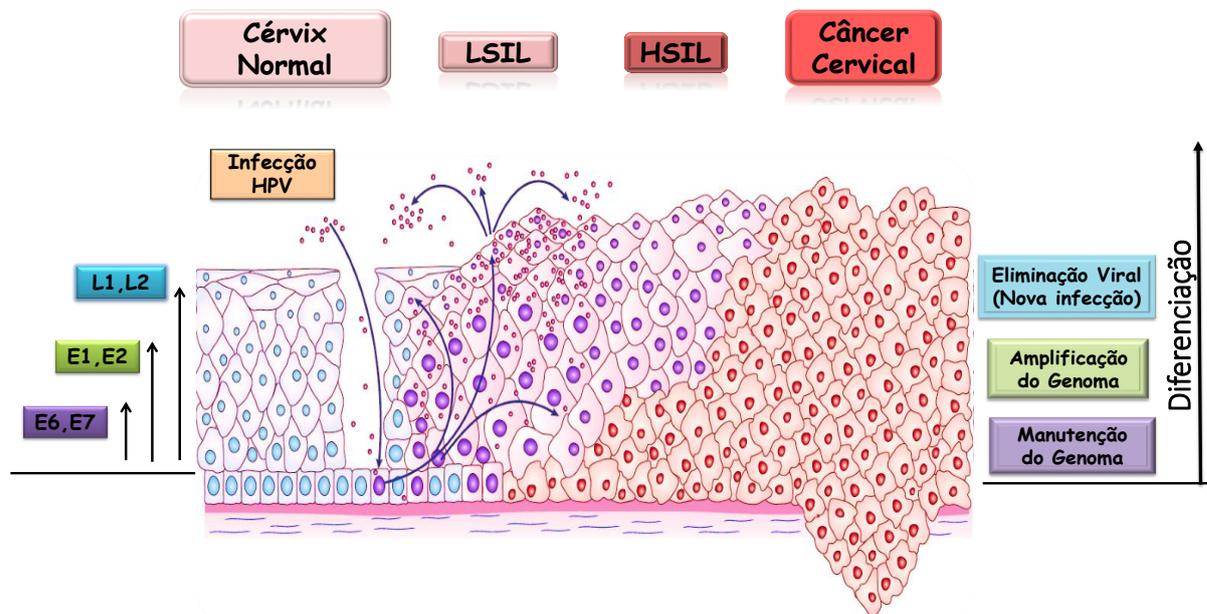
**Figura 1:** Genoma HPV, esquema representativo com as principais ações das proteínas virais. Fonte: Adaptado de Passos et al., 2008; Munoz, 2006. Imagem disponível: <https://www.genpathdiagnostics.com/womens-health/gencerv/#prettyPhoto>

## 2.2 O papel das proteínas virais

O ciclo biológico do HPV está associado a outros vários fatores que influenciam diretamente as mudanças de um padrão celular normal, como o desenvolvimento de lesões precursoras pré-malignas, caracterizadas por atipias celulares, presença de imaturidade e desorganizações celulares, anormalidades nucleares, aumento da atividade mitótica com grande potencial para malignidade (APGAR; ZOSCHNICK; WRIGHT, 2003a; VILLIERS et al., 2004).

O epitélio estratificado da pele ou mucosa, é constituído por várias camadas de queratinócitos em vários estágios de diferenciação, sobre uma camada basal de células proliferativas. Após a infecção inicial que ocorre geralmente por microabrasões das células do epitélio basal, o genoma do HPV induz uma infecção persistente replicando seu DNA em sincronia com os elementos extracromossomais do genoma do hospedeiro, onde continuam a avançar através da camada epitelial (MCBRIDE; JANG, 2013; MCKINNEY; HUSSMANN; MCBRIDE, 2015)

Na medida em que ocorre esse avanço no epitélio para as camadas mais superficiais ocorre o processo de diferenciação celular que é manipulado e regulado pelas proteínas E6 e E7 do HPV. Além disso, os níveis das proteínas de replicação E1 e E2 tornam-se aumentados concomitante com os níveis de replicação viral bem como proteínas L1 e L2, são sintetizadas, e novas partículas virais são montadas e eliminadas, ocorrendo assim infecção de novas células do epitélio (MCKINNEY; HUSSMANN; MCBRIDE, 2015). – **Figura 2**



**Figura 2:** Epitélio estratificado infectado pelo HPV mostrando o genoma viral nas camadas basais e o processo de diferenciação onde o genoma viral é amplificado e embalado em partículas virais durante o ciclo de vida do papilomavírus. **Fonte:** Adaptado de WALLACE, N. A.; GALLOWAY, 2014.

As proteínas virais produzidas pelos genes da região (E) desempenham diferentes funções moleculares no ciclo de vida do HPV e são na atualidade muito estudadas como novos alvos terapêuticos ou aperfeiçoamento de terapêutica já aplicada. As principais funções destas proteínas são:

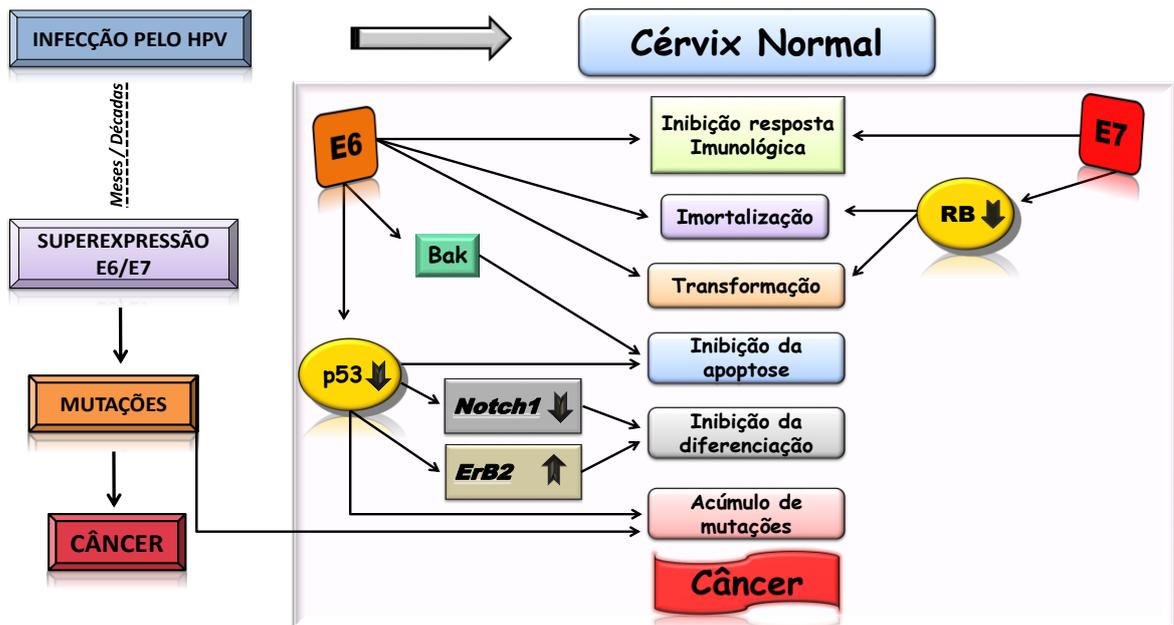
- E1= Replicação do DNA viral atuando como sítio de abertura do gene e recrutamento da DNA polimerase  $\alpha$ /primase hospedeira para o recrutamento da maquinaria de replicação do DNA celular designado a replicação viral. Além disso, a E1 interage e se liga a ubiquitina9 (Ubc9) que é necessária para a eficiência da replicação dependente da origem
  
- E2 = é uma proteína multifuncional, podendo funcionar como ativadora transcricional ou como repressora, sendo mediada através de interações com fatores celulares específicos. Participa da transcrição e replicação viral e repressão da transcrição de E6 e E7 em células com infecção latente, ligando-se a E1 e aumentando a habilidade da E1 se ligar a origem de replicação

- E4 = diminui a integridade do queratinócito rompendo o citoesqueleto de queratina, sugerindo participação na liberação viral, apesar da E4 ser encontrada em altos níveis em tecidos infectados, sua função não é exatamente conhecida

- E5, E6 e E7 = estímulo da proliferação e transformação celular como transdução de sinais dos receptores do fator de crescimento endotelial (EGFR) com ligação direta, potencializando a sinalização induzida por esse receptor, degradação de p53 via proteossomos, podendo alterar a diferenciação de queratinócitos, bem como ligação e bloqueio dos efeitos dos supressores tumorais p21<sup>WAF1/CIP1</sup> e p27<sup>KIP1</sup>. Além dessas, a proteína E7 do HPV de alto risco parece contribuir na condução de vias de sobrevivência celular pelo aumento da fosforilação pela proteína quinase Akt<sup>27</sup>. Todos esses processos culminam no favorecimento da proliferação celular descontrolada, imortalização, regulação da diferenciação celular, suscetibilidade à metástase e escape da vigilância imunológica (CHOW; BROKER; STEINBERG, 2010; RAPAPORT, 2015; LIMA; SILVA; RABENHORS, 2013; YIM; PARK, 2005).

Dentre as principais atividades atribuídas às proteínas precoces virais do HPV produzidas pela região (E) é notória a relevância na carcinogênese da E6 e E7, por promoverem a degradação das proteínas celulares p53 e da proteína do retinoblastoma (pRb), respectivamente, efeito que responde por grande parte do potencial oncogênico observado em diversos tumores. Alguns trabalhos também apontam a proteína E5 como coadjuvante nessa carcinogênese (LIMA; SILVA; RABENHORS, 2013).

Além disso, E6 e E7 funcionam em cooperação no desenvolvimento da carcinogênese causada pelo HPV. Logo após a superexpressão dessas proteínas devido à integração accidental ao genoma do hospedeiro; eventos subsequentes em genes essenciais do ciclo celular podem ocorrer em curto período de tempo, induzindo a instabilidade cromossômica e conseqüentemente o CC, pois em lesões pré-cancerosas essas proteínas são expressas em níveis muito mais elevados do que em lesões benignas (NARISAWA-SAITO; KIYONO, 2007). **Figura – 3**



**Figura 3:** Mecanismo do desenvolvimento do câncer cervical causado pela ação dos oncogenes E6 e E7 na inativação de genes supressores de tumor (p53 e Rb), levando à instabilidade genômica, bloqueio da apoptose e indução da síntese de DNA em queratinócitos infectados; atuando em pontos chaves do controle do ciclo celular. **Fonte:** Adaptado de Narisawa-saito, Mako; Kiyono, T, 2007.

Diante dessa forte relação com a evolução das lesões de colo uterino há evidentes indícios de que os transcritos E6 e E7 do HPV podem representar fortes marcadores biológicos, sendo úteis na determinação do risco de progressão das NICs como potenciais preditivos da evolução das lesões precursoras do câncer de colo uterino (FERRAZ et al., 2012).

### 3- Classificação das Neoplasias Intraepiteliais e o câncer de colo de útero

#### 3.1 – Neoplasia intraepitelial cervical

As lesões cervicais precursoras do CC apresentam-se em diferentes graus evolutivos, do ponto de vista cito e histopatológico e são fortemente associadas a mudanças morfológicas das células e aos tipos específicos de alto risco do HPV (AIDÉ et al., 2009), que demonstram ser uma causa necessária para o desenvolvimento da grande maioria dos casos de câncer cervical e suas imediatas neoplasias precursoras que geram etapas sequenciais da carcinogênese cervical (MOSCICKI et al., 2006).

Sir Julius Vogel (1843) foi o pioneiro da citologia como meio diagnóstico. Mas foi somente na segunda metade do século XX que a citopatologia se firmou como ciência, graças especialmente ao trabalho do Dr. George Papanicolaou (1943), que com a colaboração de Herbert Traut, um ginecologista treinado em patologia, publicou uma monografia intitulada “Diagnóstico de câncer uterino pelo esfregaço vaginal”, onde propôs uma classificação citológica que distingue 5 classes de esfregaços (LIMA et al., 2012).

- Classe I: Ausência de células atípicas ou anormais.
- Classe II: Citologia atípica sem evidência de malignidade.
- Classe III: Citologia sugerindo, sem certeza, malignidade.
- Classe IV: Citologia muito suspeita de malignidade.
- Classe V: Citologia maligna

Em 1967, Richart propôs conceitos para avaliar as alterações causadas no colo uterino, as quais se chamou de neoplasia intraepitelial e no caso da cérvix uterina, de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) subdividida histologicamente em três graus:

- NIC I = displasia leve (caracterizada por atipias celulares localizadas no terço inferior do epitélio escamoso)

- NIC II = displasia moderada (em que as atipias ocupam os dois terços inferiores desse epitélio)

- NIC III = displasia acentuada e carcinoma in situ (em que as células atípicas comprometem mais de 2/3 ou toda a espessura do epitélio)

Para essas alterações foi considerado um fenômeno único, contínuo e progressivo, caracterizadas por diversos graus de atipias celulares que compreende parte ou toda a espessura do epitélio cervical. Posteriormente, ainda se tratando de neoplasias e considerando o HPV como agente causal do câncer escamoso cervical, foi sugerido que as lesões precursoras passassem para duas classificações:

- NIC de baixo grau com alterações relacionadas ao HPV
- NIC de alto grau evidenciado por lesões que têm as características morfológicas de precursoras do câncer (RICHART, 1990; RICHART R M, 1967).

O diagnóstico precoce das lesões precursoras pode ser feito a partir da simples coleta da citologia cérvico-vaginal de rotina (Papanicolau) e se alterado, confirmado pela biópsia, possibilitando o tratamento dessas lesões e impedindo sua progressão para CC.

Na colposcopia, a NIC apresenta uma zona de transformação anormal representada por epitélio acetobranco, mosaico, pontilhado, leucoplasia e vasos atípicos (ROKITA, 2006).

Em 1988, a classificação de Bethesda subdividiu as neoplasias intraepiteliais cervicais após críticas devido à palavra “neoplasia” ser descrita mostrando que uma anormalidade leve poderia causar uma falsa impressão para o clínico, e dessa forma propôs uniformizar as terminologias, assim como as condutas clínicas para cada classificação citológica. Dessa maneira, propôs a classificação das neoplasias da seguinte forma: Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau

(LSIL), compreendendo: Displasia leve/ NIC I e alterações celulares associadas ao Papiloma Vírus Humano (HPV); Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL): Displasia moderada/ NIC II, Displasia severa, Carcinoma in situ / NIC III (APGAR; ZOSCHNICK; WRIGHT, 2003b; SMITH, 2002).

Esse sistema passou por atualizações em 1991 e 2001 e é nesse tipo de classificação que se baseia a Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais. As atipias escamosas foram divididas em duas subcategorias: ASC-US e células escamosas atípicas, nas quais não se pode excluir lesão de alto grau (ASC-H) (AGUIAR et al., 2011; SOLOMON et al., 2002). Dessa forma, a evolução das nomenclaturas diagnósticas no exame ginecológico revolucionou o mundo, trazendo uma forma menos invasiva para detecção do CC e salvando a vida de milhares de mulheres que encontraram na prevenção uma forma poderosa e eficaz de combate ao câncer de colo uterino.

### **3.2 – Câncer de colo de útero e fatores de risco**

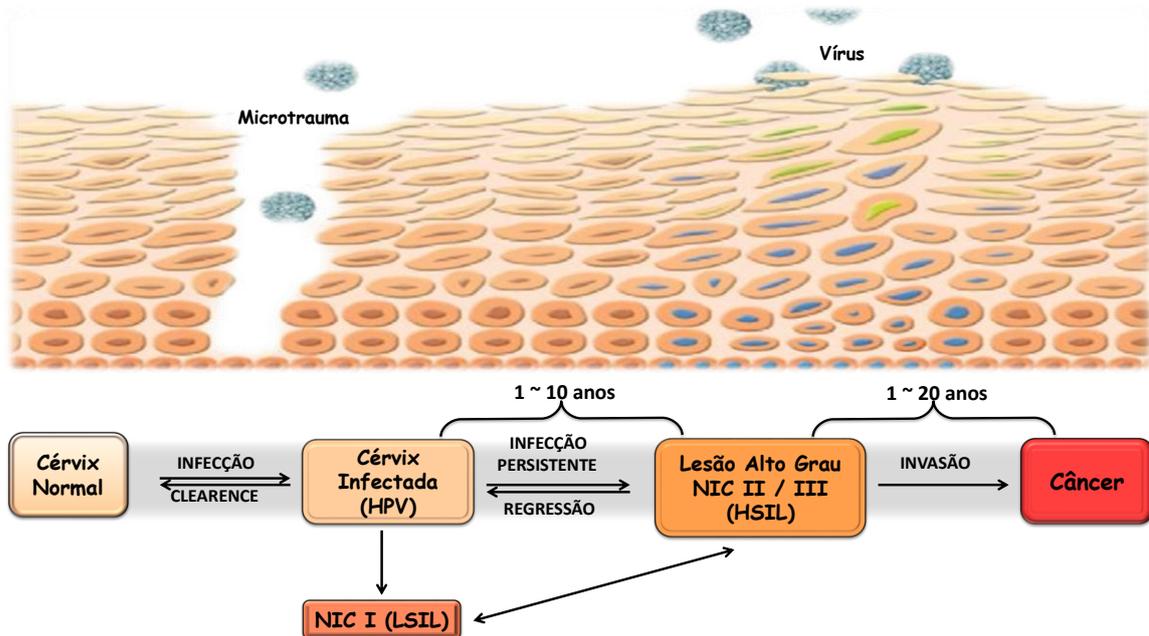
A formação da neoplasia está relacionada a vários processos e mecanismos genéticos que transformam a célula levando ao tumor, havendo sempre a necessidade de eventos biológicos e moleculares para que se dê a progressão da doença (JOHNSON et al., 1991).

O desenvolvimento da carcinogênese é um processo dinâmico que envolve vários fatores intrínsecos e extrínsecos como a infecção persistente pelo vírus HPV, lesões prévias como NICs, sendo que estas podem regredir ou progredir para o câncer invasivo, pois cerca de 80 a 90% das infecções por HPV de alto risco apresentam remissão com o tempo com apenas 10 a 20% dos indivíduos desenvolvendo infecções persistentes (STANLEY MA, PETT MR, 2007).

Estes mecanismos podem ocorrer em intervalos de até 20 anos de história natural do curso da doença, podendo eventos intermediários ao CC serem

diagnosticados por programas de triagem ou eliminados naturalmente, sendo que uma minoria das infecções tornam-se persistentes, aumentando assim a possibilidade de transformação celular e posteriormente a lesões pré-neoplásicas (NICs) e cancerígenas (NO et al., 2011; RAUTAVA; SYRJÄNEN, 2011) – **Figura 4**

Esta progressão com lesão proliferativa, maturação anormal e atipias de graus variáveis substitui parte ou toda a espessura do epitélio escamoso cervical (AIDÉ et al., 2009), mas na maioria das vezes o sistema imune pode ser capaz de erradicar o processo infeccioso eliminando o vírus (Passos et al., 2008).



**Figura 4:** Multiprocesso da carcinogênese pelo HPV. O passo inicial da infecção cervical que pode sofrer regressão parcial ou total pela resposta imunológica do hospedeiro, ou ainda a persistência da infecção apresentada como um processo essencial para a progressão e invasão do câncer. **Fonte:** Adaptado de No et., 2011.

Estudos epidemiológicos realizados nos últimos 30 anos indicaram consistentemente que o risco de câncer está fortemente influenciado por fatores de risco variados (FRANCO; DUARTE-FRANCO; FERENCZY, 2001).

Vários estudos ao longo dos anos têm associado diversos fatores (**Tabela 1**) ao desenvolvimento do CC, como por exemplo: o uso de contraceptivos orais, idade, tabagismo, múltiplos parceiros, relação sexual precoce, infecções de

repetição e concomitantes por outros agentes infecciosos e falta de exames citopatológicos ou alteração destes sem o acompanhamento do ginecologista podem influenciar diretamente no ciclo da doença.

**Tabela 1:** Fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de colo de útero

Autor	Título
CASTELLSAGUE; MUNOZ, 2003	Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking.
HOLSCHNEIDER et al., 2005	The fragile histidine triad gene: a molecular link between cigarette smoking and cervical cancer
ZENG XT et al., 2012	Passive smoking and cervical cancer risk: a meta-analysis based on 3,230 cases and 2,982 controls.
MURTA et al., 2001	Human Papillomavirus Infection in Adolescents: Relation to Contraceptive Method, Pregnancy, Smoking, and Cytologic Findings
NOGUERES, 2010	Associação entre a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e outras infecções genitais femininas
OLIVEIRA et al., 2013	Fatores de risco e prevalência da infecção pelo HPV em pacientes de Unidades Básicas de Saúde e de um Hospital Universitário do Sul do Brasil
UCHIMURA et al., 2005	Influência do uso de anticoncepcionais hormonais orais sobre o número de células de Langerhans em mulheres com captura híbrida negativa para papilomavírus humano.
BRISSON et al., 1994	Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low- and high-grade lesions
CASTELLSAGUE et al., 2006	Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: Implications for screening and prevention
DARLING et al., 1996	The relationship of human papillomavirus-related cervical tumors to cigarette smoking, oral contraceptive use, and prior herpes simplex virus type 2 infection
HILDESHEIM A et al., 2001	HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica.
KJAER S. K, 1998	Risk factors for cervical neoplasia in Denmark
KJELLBERG L et al., 2000	Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection.
SCOTT et al., 2006	Covariates of cervical cytokine mRNA expression by real-time PCR in adolescents and young women: effects of Chlamydia trachomatis infection, hormonal contraception, and smoking
ROTELI-MARTINS C M et al., 1998	Cigarette smoking and high-risk HPV DNA as predisposing factors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in young Brazilian women.
SMITH J. S. et al., 2002	Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer
WU, M.T. et al., 2003	Lifetime exposure to environmental tobacco smoke and

ZENG, X. et al., 2012  
cervical intraepithelial neoplasms among nonsmoking Taiwanese women.  
Passive Smoking and Cervical Cancer Risk: A Meta-analysis Based on 3,230 Cases and 2,982 Controls.

---

Além disso, a predisposição genética (inativação de genes supressores de tumores e a ativação de oncogêneses) de cada paciente associado a fatores epigenéticos como metilação do DNA, remodelação das cromatinas, modificação de histonas e a regulamentação de mRNAs, parecem estar associados ao CC, criando mecanismos da patogênese viral que ainda não estão totalmente claros, podendo dessa forma alterar o sistema imunológico e comprometer a defesa do organismo, facilitando a progressão da doença (MEIJER, 2014; SAAVEDRA; BREBI; ROA, 2012).

Dessa forma, a infecção induzida pelo HPV aliado ao acúmulo gradual de alterações genéticas e epigenéticas altera o microambiente tumoral podendo ditar a função do tecido modificado pelas células cancerosas para produzir uma variedade de fatores de crescimento, quimiocinas e enzimas de degradação da matriz que aumentam a proliferação e invasão do tumor (CHEN et al., 2015; JOYCE, 2005).

### **3.3 – Resposta imune ao tumor e o papel das citocinas**

A proliferação de células normais é cuidadosamente regulada pelo nosso organismo. Mas quando são expostas a agentes infecciosos que exercem um papel central na carcinogênese como o HPV de alto risco, estas podem sofrer mutações que levam à sua transformação celular que influenciam direta ou indiretamente na instalação deste mecanismo no epitélio escamoso cervical.

Descrita no século passado por imunologistas, a teoria da vigilância imunológica propunha que o sistema imune era responsável pelo monitoramento e

controle do desenvolvimento dessas células precursoras tumorais, sendo capazes de reconhecer e eliminar os clones de células mutadas antes que elas se desenvolvessem em tumores (BURNET, 1957; THOMAS, 1982)

Para isso é necessária a interação de múltiplos mecanismos e componentes da imunidade inata e adaptativa como barreiras (pele, secreções, mucosas e cílios), células e moléculas (citocinas, quimiocinas e as proteínas do complemento e de fase aguda) que estão intimamente conectados por uma rede de órgãos e sistemas para manter a homeostase do organismo e eliminar possíveis agentes agressores como células tumorais (CRUVINEL et al., 2010).

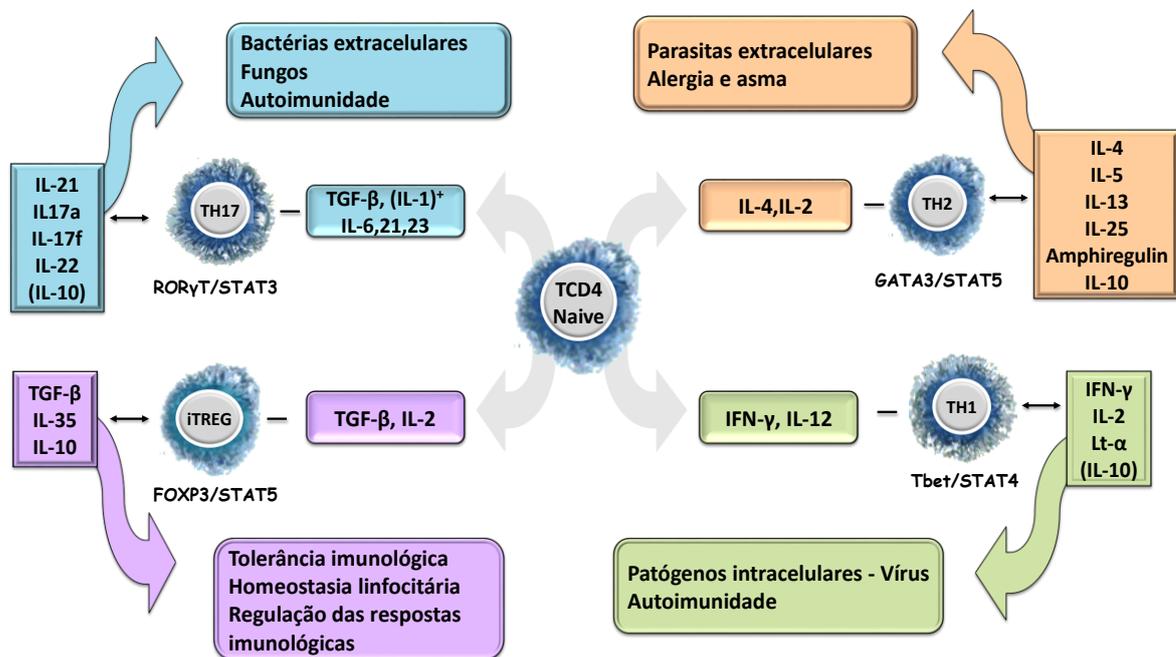
Uma das principais características que diferem a imunidade adaptativa da imunidade inata é o reconhecimento de epítomos de antígenos através de receptores especializados presentes na superfície dos linfócitos. Esse é um dos fatores que podem potencializar a resposta, sobretudo a antígenos tumorais, bem como a capacidade de algumas células, como DCs de realizarem apresentação cruzada, ou seja, elas são capazes de apresentar o antígeno através do MHC I para os linfócitos T CD8<sup>+</sup> e ao mesmo tempo, via MHC II aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, potencializando assim uma a ação conjunta da imunidade inata e adquirida na contenção e/ou eliminação de uma patologia, incluindo a eliminação de tumores. (GUERMONPREZ, et al, 2003).

As principais células que compõe esses dois braços do SI são as apresentadoras de antígeno (APCs), que compreendem as células dendríticas, monócitos, macrófagos e células NK. Já na imunidade adaptativa, fazem parte os linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> (T Helper) e TCD8<sup>+</sup> citotóxicos que reconhecem e eliminam patógenos, juntamente com os linfócitos B presentes na imunidade humoral (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Esses dois braços do SI promovem a indução de respostas imunes rápidas e tardias (memória imunológica) contra as células tumorais, podendo utilizar para isso sinais gerados pela imunidade inata como receptores padrões moleculares associados ao patógeno (*Toll-like receptors*) que reconhecem alvos moleculares essenciais para a sobrevivência dos patógenos (STANLEY, 2006).

Além desse sinal, células presentes na imunidade adquirida como as células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> reconhecem antígenos no complexo MHC classe I e II presentes nas APCs e tornam-se ativadas, proliferando-se e tornando-se células efetoras ou diferenciadas, com diferentes fatores de transcrição, os quais produzem diferentes perfis de resposta imune contra diferentes agentes agressores, bem como participam diretamente processos patológicos. - **Figura 5**

Essa imunidade mediada por células é fundamental na defesa contra patógenos intracelulares como o vírus HPV, pois durante um processo inflamatório o microambiente imunológico do trato genital feminino é afetado e são encontradas diferentes populações celulares no epitélio escamoso, estroma, zona de transformação e mucosa vaginal, com variações regionais na localização e abundância de subpopulações de linfócitos T e células apresentadoras de antígeno (PUDNEY; QUAYLE; ANDERSON, 2005).



**Figura 5:** Perfis de resposta imune da diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> naive, com as citocinas produzidas que caracterizam cada perfil e fatores de transcrição para a determinação do perfil imunológico. **Fonte:** Adaptado ZHU & PAUL, 2008

As citocinas liberadas pelas células, além de exercerem um papel importante na infecção pelo HPV, podem ainda modular padrões de resposta contra

diferentes agentes agressores, polarizando a resposta imunológica para o padrão Th1/Th2 essenciais no combate ao tumor (Fernandes et al., 2005), como por exemplo a secreção de IFN- $\gamma$  que cria um ambiente favorável para respostas citotóxicas efetoras, onde macrófagos, células NK e linfócitos T CD8<sup>+</sup> são ativados gerando a imunidade mediada por células (IGNEY; KRAMMER, 2002).

Citocinas são pequenos polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares e hidrossolúveis, produzidos por diversas células do SI que variam entre 8 e 30 kDa e tem por finalidade atuar como mecanismos autócrinos e parácrinos desenvolvendo funções pleiotrópicas em forma de cascata, ligando-se sempre a receptores específicos que regulam a transcrição gênica, influenciando na atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência de outras células imunológicas com diversas funções e sítios de atuação (ABBAS; LICHTMAN; PLLAI, 2012) – **Tabela 2**

**Tabela 2:** Resumo das principais citocinas produzidas pelo sistema imune, suas fontes, ações pleiotrópicas e receptores.

<b>Citocina</b>	<b>Fonte</b>	<b>Principais alvos e efeitos biológicos</b>	<b>Receptor (es)</b>
<b><u>IL-2</u></b>	Células T	Células T: proliferação, diferenciação, desenvolvimento Tregs (sobrevivência e função). Células NK: proliferação, ativação Células B: proliferação e síntese de anticorpos ( <i>in vivo</i> )	CD25(IL-2R $\alpha$ ) CD122(IL-2R $\beta$ ) CD132 ( $\gamma$ c)
<b><u>IL-12</u></b> <b>IL-12A (p35)</b> <b>IL-12B (p40)</b>	Macrófagos e células dendríticas	Diferenciação TH1 em Células T e síntese de IFN- $\gamma$ e aumento da atividade citotóxica em células NK e Células T	CD212(IL12R $\beta$ 1) (IL-12R $\beta$ 2)
<b><u>IL-10</u></b>	Macrófagos e Células T (TRegs)	Macrófagos, Células dendríticas: inibição IL-12, coestimuladores e MHC II	CD210(IL-10R1) CD210B (IL- 10R2)
<b><u>IFN-<math>\gamma</math></u></b>	Células T (TH1, T, CD8 <sup>+</sup> ) e NK	Ativação de macrófagos, aumento da expressão de MHC I e II e componentes de processamento de	CD119 (IFNGR1) IFNGR2

		antígenos, supressão de TH2 e diferenciação TH1	
<b><u>TNF-<math>\alpha</math></u></b> (TNF, TNFSF1)	Células T, macrófagos e NK	Inflamação local, coagulação, ativação endotelial e caquexia	CD120a (TNFRSF1) CD120b (TNFRSF2)
<b><u>TGF-<math>\beta</math></u></b>	Condrócitos, macrófagos e Células T (Tregs)	Inibe o crescimento celular, anti-inflamatório, induz mudança de classe para produção de IgA, perfil regulatório	Grupos Alk, TGF- $\beta$ R2, BMP RII, Act RII, Act RIIB e MIS RII
<b><u>IL-4</u></b>	Células T CD4 <sup>+</sup> (TH2), mastócitos	Ativação de células B, mudança de classe para IgE, diferenciação para perfil TH2, proliferação, inibição IFN- $\gamma$ (macrófagos)	CD124 (IL4R $\alpha$ ) CD 132 ( $\gamma$ c)
<b><u>IL-6</u></b>	Células T, macrófagos e Células endoteliais	Crescimento e diferenciação de Células T e B (produção de anticorpos), produção de proteínas da fase aguda, febre	CD126 (IL-6R $\alpha$ ) CD130 (gp130)

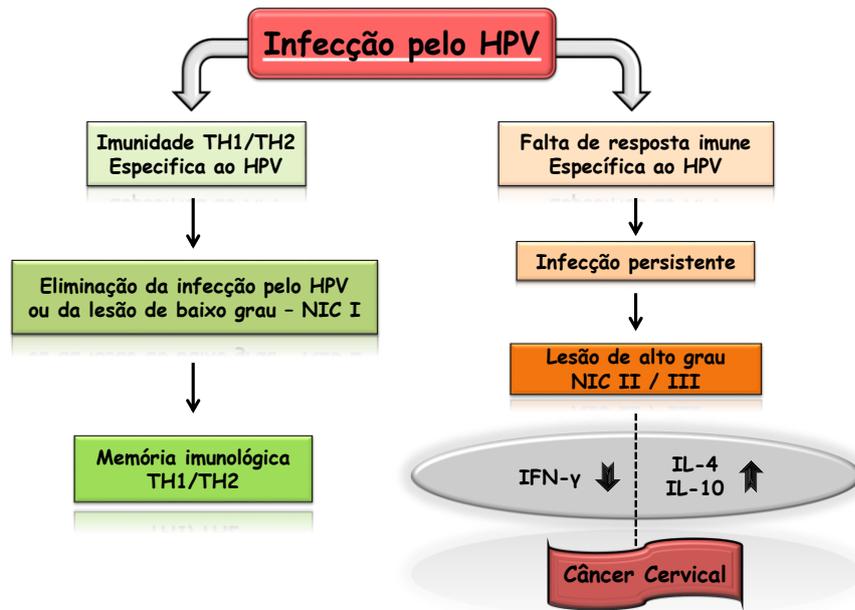
**Fonte:** Adaptado CAESTECKER, 2004; ABBAS; LICHTMAN; PLLAI, 2012.

O IFN- $\gamma$  produzido pelas células TCD4<sup>+</sup> efectoras do perfil TH1 são moléculas chaves para a ativação de células efectoras citotóxicas – macrófagos, células NK e linfócitos TCD8<sup>+</sup>, gerando imunidade celular de grande importância contra a infecção viral (STANLEY, 2006).

Trabalhos avaliando o perfil de resposta imune frente ao HPV sugeriram que uma diminuição da resposta TH1 com aumento do perfil TH2 bem como de suas citocinas características (IL-4 e IL-10) estão relacionados com o desenvolvimento do câncer cervical e das lesões pré-cancerosas (SCOTT et al., 1999; VERHEIJEN et al., 1999).

Outros estudos sugeriram também que uma resposta TH1 está associada ao clearance viral (CLERICI et al., 1997; LOPEZ E STANLEY, 2000) e a resposta TH2 na persistência da infecção pelo HPV (SONG et al., 2008) e que durante a carcinogênese do epitélio cervical ocorre uma mudança de resposta TH1 para TH2 (AZAR et al., 2004; DELGADO et al., 2009).

Dessa maneira, com mudança na regulação das citocinas produzidas pela imunidade celular como o IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 ou de outras citocinas podem explicar a perda imunológica do controle do HPV e suas complicações oncológicas que levam ao CC. - **Figura 6**



**Figura 6:** Imunidade das células TCD4<sup>+</sup> contra HPV16. **Fonte:** Adaptado Van Der Burg et al., 2004.

### 3.4 – O uso do Interferon nas imunoterapias

Descoberto no século passado por Isaac & Lindenmann (1957) como substância promissora capaz de inibir a replicação viral, os Interferons são a uma família de glicoproteínas de grande importância nas respostas imunes que desempenham um papel na comunicação entre as células e seu ambiente externo, produzindo uma resposta a estímulos externos quando se ligam ao seu receptor específico (DONNELLY; KOTENKO, 2010; LASFAR et al., 2006). **Tabela 3**

Os IFNs atuam claramente a montante de muitas vias de sinalização importantes, as quais são compostas basicamente pelo seu receptor, Janus Kinase

(JAK) e Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT). Logo após sua ligação a complexos receptores distintos na membrana das células, como por exemplo do interferon tipo I, ativa a via de sinalização JAK-STAT, levando à fosforilação de STAT-1 e STAT-2, que se combinam ao fator de regulação 9 (IRF9) para formar um complexo conhecido como fator do gene estimulado por interferon 3 (ISGF3), que então é translocado para o núcleo e se liga ao elemento de resposta interferon-sensível (ISRE), levando à transcrição de um subgrupo de genes conhecidos como genes estimulados pelo interferon (ISGs), que atuam na resposta antiviral. (BALDRIDGE; KING; GOODELL, 2012; IVASHKIV; DONLIN, 2015).

**Tabela 3:** A família dos Interferons e suas principais características

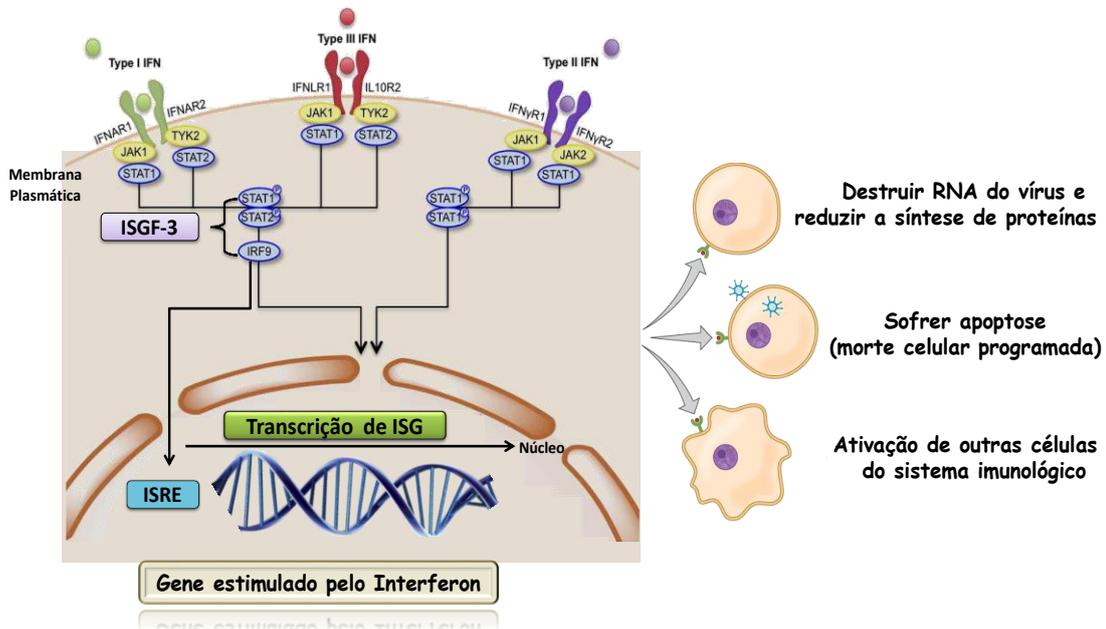
<b>Tipo</b>	<b>SUBTIPO</b>	<b>FONTE</b>	<b>ALVO</b>	<b>RECEPTOR</b>	<b>SINALIZAÇÃO</b>
I	$\alpha$	Todo organismo	Todo organismo	IFNAR1	JAK1
	$\beta$			IFNAR2	TYK2
	$\delta$				STAT1
	$\epsilon$				STAT2
	$\zeta$				
	$\kappa$				
	$\nu$				
	$\tau$				
	$\omega$				
II	$\gamma$	Células NK, NKT, APCs, Linfócitos T e B	Todo organismo	IFN $\gamma$ R1	JAK1
				IFN $\gamma$ R2	JAK2 STAT1
III	$\lambda 1$ (Interleucina-29)	Todo organismo	Células epiteliais, hepatócitos	IFNLR1 (IL-28AR)	JAK1
	$\lambda 2$ (Inteleucina-28a)			IL10R2	TYK2
	$\lambda 3$ (Inteleucina-28b)				STAT1
	$\lambda 4$				STAT2

**Adaptado:** DONNELLY, R. P. et al., 2004 e DUSSURGET et al., 2014

Os IFN de Tipo I são importantes mediadores da comunicação intercelular, pois além de possuírem propriedades antivirais, antiproliferativas e imunomoduladoras, desempenham função na regulação do crescimento celular, além de possuir atividade antitumoral (LASFAR et al., 2006). A maioria das células do sistema imune podem produzir IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  como, por exemplo, leucócitos infectados por vírus e fibroblastos, enquanto o IFN- $\gamma$  é produzido apenas por certas células incluindo as células NK, T helper 1 CD4 + (T H 1) e células citotóxicas CD8+ funcionando como promotora da polarização linfocítica, designado como interferon imune (KATZE et al., 2002).

As outras vias de sinalização dos IFNs induzidas por essa ligação são semelhantes à do tipo I, onde ocorre a ativação da JAK1 e TyK2, resultando na ativação do fator 3 estimulador do interferon (ISGF3) com consequente ativação do gene estimulado pelo interferon (LASFAR et al., 2006). Após essa cascata de sinalização, o interferon é liberado pelas células ativadas atuando em diversas outras células na indução e destruição de vírus, apoptose e ativação do sistema imunológico. **Figura 7**

Estudos têm demonstrado que a proteína E6 do HPV-16 de alto risco consegue se ligar ao fator 3 estimulador do interferon-IRF-3 podendo inibir sua função de ativação transcricional, com consequente diminuição da produção dessa citocina (RONCO et al., 1998).



**Figura 7:** Vias de sinalização do interferon com as diversas funções efetoras resultantes da sua produção nas células do organismo. Adaptado: DUSSURGET et al., 2014.

Sabendo do grande potencial do interferon na atividade antiviral e que a produção deste pelas diversas células do organismo pode aumentar a imunidade inata bem como o desenvolvimento de células T CD4<sup>+</sup>, células TH1 e células T CD8<sup>+</sup> (IKEDA; OLD; SCHREIBER, 2002), diversos estudos tem utilizado esta citocina como intervenções terapêuticas em lesões induzidas pelo HPV (MARDEGAN, 2008; MICHELIN et al., 2015; MISSON et al., 2011).

Desde que foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), o uso da imunoterapia com interferon entrou em larga escala em ensaios clínicos e muito se aprendeu sobre sua ação como agente único, onde tem mostrado grande eficácia antitumoral e antiviral contra vários tumores e vírus relacionados aos tumores bem como nos tratamentos de várias doenças infecciosas (J, 2002; LM, 1992).

Trabalhos têm revelado que sua administração como terapia obteve respostas clínicas em 90% dos de leucemia de células pilosas, 40% dos casos de sarcoma de Kaposi que ocorre principalmente em associação com a AIDS, 65% dos linfomas e em mais de 80% dos pacientes com leucemia mielóide crônica nos

primeiros casos (BAJCETIĆ M, ZIGON N, SAMARDZIĆ R, 1998). Outros estudos, relacionando o uso do IFN em pacientes com hepatite confirmaram benefício em 25 a 40% dos casos de Hepatite B crônica e melhoria rápida dos marcadores bioquímicos para aqueles pacientes com Hepatite C (FINTER NB, CHAPMAN S, DOWD P, JOHNSTON JM, MANNA V, SARANTIS N, SHERON N, SCOTT G, PHUA S, 1991).

O vírus HPV exibe uma ampla gama de estratégias para evadir a vigilância imunológica, gerando um microambiente anti-inflamatório favorável com supressão de células T específicas (ALFREDO AMADOR-MOLINA, JOSÉ FERNANDO HERNÁNDEZ-VALENCIA, EDMUNDO LAMOYI, 2013) além de ter como agravante sua carga viral como um dos fatores determinantes da persistência do vírus com maior risco de lesões de alto grau (MUNOZ et al., 2009).

Dessa maneira, sabendo que o padrão de resposta imune TH2 está associado com persistência do HPV com consequente desenvolvimento de neoplasias (BURGER et al., 1999; SYRJÄNEN et al., 2009) e visando uma melhor compreensão dessa resposta imunológica como tolerância imune e/ou imunossupressão, faz-se necessário o uso de imunomoduladores como IFN no tratamento da(s) lesão(ões) causadas pelo vírus, pois esse tratamento pode trazer grandes benefícios para pacientes jovens com o resgate do sistema imunológico, evitando assim o uso de terapias convencionais e agressivas para as lesões causadas pela infecção do vírus. Além disso, um estudo realizado por Michelin e colaboradores utilizando o IFN $\alpha$ -2b peguilado subcutâneo, foi observado que no sangue periférico de pacientes com NIC II e III houve aumento significativo na produção de IFN- $\alpha$  por linfócitos T Helper em resposta ao tratamento, com regressão da lesão neoplásica.

## *4-Justificativa*

#### 4 - JUSTIFICATIVA

O presente trabalho visa avaliar o perfil imunológico nas secreções endocervicais de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical grau II e III frente ao tratamento com interferon- $\alpha$  peguilado, buscando compreender o seu funcionamento como uma nova medida terapêutica contra o CC e suas neoplasias precursoras. Os bons resultados podem minimizar procedimentos invasivos e diminuir os riscos relacionados a problemas obstétricos como estenose do canal cervical, incompetência istmo-cervical, trabalho de parto pré-termo, amniorrexe prematura e corioamnionite.

A imunoterapia poderá a ser utilizada em novas abordagens e diminuindo a possibilidade de procedimentos convencionais como a conização ou traquelectomia radical, preservando assim o colo uterino e a capacidade de reprodutiva de pacientes principalmente aquelas mais jovens.

## ***5-Objetivos***

## 5 - OBJETIVOS

1. Avaliar o perfil de citocinas (IL-2, IL-12, TNF, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10) antes e durante o processo de imunoterapia por interferon por ELISA nas secreções endocervicais de pacientes com NIC II e III submetidas ao tratamento com interferon  $\alpha$  2b peguilado.

2. Avaliar o perfil do mesmo grupo de citocinas naquelas pacientes que tiveram Boa e Má resposta frente ao tratamento com interferon alfa 2b peguilado após a terapia.

## ***6-Causuística & Métodos***

## 6 - CAUSUÍSTICA & MÉTODOS

### 6.1. CASUÍSTICA

Este estudo prospectivo foi realizado com 16 pacientes no Ambulatório Maria da Glória – UFTM, no período de 2011 a 2015. Estas mulheres foram atendidas em conjunto pelas Disciplinas de Ginecologia/Obstetrícia e Imunologia. Todas as pacientes foram rastreadas por citologia cervicovaginal, colposcopia e posteriormente com confirmação diagnóstica para Neoplasia Intraepitelial Cervical graus II e III (Alto grau) por exame histopatológico.

Não ocorreu intervenção prévia em nenhuma das pacientes devido à infecção pelo HPV. Após orientação quanto ao tratamento com interferon alfa 2b peguilado (IFN- $\alpha$  2b) todas elas foram convidadas para participar do estudo, sendo então obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de cada uma.

Durante o tratamento foram coletadas amostras de secreção endocervical durante as seis aplicações de interferon para quantificação e análise do perfil das citocinas locais, bem como biópsias no início e término da terapia (1<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> aplicações) para verificação e prognóstico do tratamento.

Os critérios de regressão das lesões foram baseados nos resultados das biópsias coletadas durante o tratamento, as quais foram encaminhadas para o serviço de patologia cirúrgica da UFTM para serem analisadas por patologistas da instituição.

O tratamento com IFN- $\alpha$  2b consistiu em seis aplicações subcutâneas durante seis semanas. Em cada aplicação foram coletadas amostras da endocervix e estocadas em alíquotas de 500 $\mu$ L em freezer (-80<sup>o</sup> C) até o dia do experimento.

Para a coleta de biópsias e exame de colposcopia de cada paciente, seguimos as normas da INTERNACIONAL FEDERATION FOR CERVICAL PATHOLOGY AND COLPOSCOPY (IFCPC) determinada em Roma, no ano de 1990 (STAFIL A, 1991) para classificação colposcópica. Nessas duas ocasiões, também

foram captadas imagens do colo do útero utilizando o exame de videocoloscopia com o auxílio do “Software” 15 Vídeo Diagnose<sup>®</sup>.

Através desse procedimento foram observadas as áreas de neoplasia bem como sinais ou não de regressão da (s) lesão (ões) após o tratamento. O exame colposcópico também contribuiu para a coleta das biópsias, sendo extraídos locais específicos e pré-selecionados da (s) lesão (ões) os quais foram imerso (s) em 1,0 ml de Trizol (TRIzol<sup>®</sup> Reagent, ambion/RNA - lifetechnologies) e armazenadas em freezer -80<sup>o</sup> C para futuros estudos.

Os critérios para inclusão foram: Ausência de sangramento, lesão de alto grau - NIC II e/ou III e citologia oncótica confirmada por biópsia, não fumantes, nenhum uso de antibióticos orais, fungicidas vaginais ou cremes ao longo dos últimos 30 dias, nenhuma atividade sexual por dois dias anteriores à coleta da amostra, JEC visível e nenhuma história prévia de tratamento para HPV.

Foram critérios de exclusão: Portadoras de doenças ou em uso de anti-inflamatório imunossupressores que não poderiam ser durante o tratamento, cardiopatias graves ou com alteração da função hepática ou renal, gestantes e relato de intolerabilidade ao interferon.

Este trabalho obedeceu critérios e recomendações contidas na Resolução nº 196/96 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – Ministério da Saúde com protocolo avaliado e aprovado em 19-11-2009 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM sob o número 1525.

## 6.2 MÉTODOS

### 6.2.1 Aplicação do Interferon

As aplicações de interferon  $\alpha$  2b-peguilado (Pegintron®) foram realizadas de forma subcutânea sendo administrada uma concentração de 80 $\mu$ g/0,5mL do medicamento semanalmente de acordo com as indicações da bula do fabricante. As datas e horários do tratamento foram feitos de acordo com o agendamento realizado pelo serviço de ginecologia do Ambulatório Maria da Glória (UFTM).

Cada caixa da medicação apresentou um frasco-ampola com pó liofilizado acompanhado de ampola com diluente que foram condicionados em geladeira à temperatura de 4°C. Para a reconstituição foram adotadas orientações descritas na bula da medicação como descrito a seguir:

**a)** Foi feito a limpeza da superfície da tampa do frasco (pó liofilizado) com algodão umedecido com álcool.

**b)** Em seguida, foi aberta a ampola de diluente e, com auxílio de uma seringa, foi retirada o de diluente da ampola.

**c)** Usando uma seringa de 1 mL para injeção foi injetado lentamente 0.7 mL de diluente pela parede de vidro do frasco contendo o pó liofilizado (não direcionando o jato diretamente no pó branco, ou injetando com rapidez a fim de evitar bolhas).

**d)** O frasco foi então girado suavemente com movimentos de rotação para completar a dissolução do pó (Não agitando).

**e)** Por fim, com o auxílio de outra seringa de 1,0 mL a solução reconstituída foi aspirada na dose apropriada para injeção subcutânea.

As aplicações foram realizadas utilizando uma seringa de 1,0 mL e agulha 13 x 0,45 mm e durante esse período de tratamento, todas as pacientes estiveram

sob acompanhamento e orientação médica devido aos efeitos colaterais do interferon.

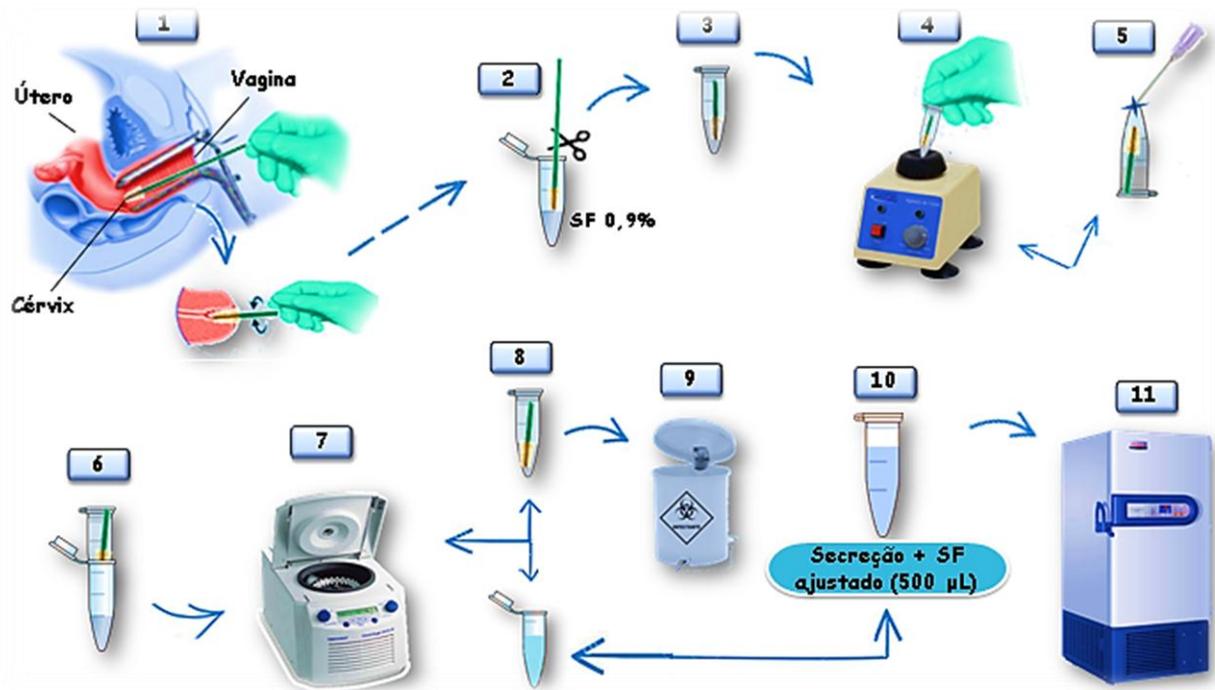
### 6.2.2 Coleta da secreção endocervical

A secreção endocervical foi coletada de todas as pacientes selecionadas de acordo com os critérios acima descritos no Ambulatório Maria da Glória por um profissional habilitado (médico) responsável pelos serviços de ginecologia e obstetrícia do Hospital de Clínicas – UFTM.

Para este procedimento foi realizada a exposição e a inspeção do colo uterino com a introdução de um espéculo vaginal e em seguida, foi introduzida uma escova para coleta do material da endocérvix, sendo então realizados movimentos giratórios para a coleta da secreção. Posteriormente foram realizadas todas as condutas e técnicas para realização do teste de Schiller e biópsia (1ª e 6ª aplicações) colposcópica da (s) área (s) com lesão (ões) neoplásica (s).

A escova contendo a secreção foi então colocada em um tubo eppendorf contendo 0,5 mL de soro fisiológico 0,9% (SF) e sua haste foi cortada para que o tudo pudesse ser fechado.

Feito isso, o eppendorf contendo a escova com a secreção foi agitado em um vortex por 1 minuto, sendo então invertido e realizado um orifício na parte inferior. Com cuidado o mesmo foi encaixado em outro tubo eppendorf e estes foram submetidos à centrifugação por 5 minutos a 300 rpm. Após a centrifugação, o eppendorf superior foi descartado e o volume da secreção mais a solução salina contidos no eppendorf (inferior) foram ajustados para 500µL com SF e o material foi estocado a -20°C para as dosagens das citocinas como exemplificado no esquema ilustrativo da **figura 8**.



**Figura 8:** Em A, coleta da secreção endocervical feita com escova citológica e com auxílio do espéculo para visualização do colo do útero. B e C introdução do tubo eppendorf em SF 0,9% e corte da haste da escova para o fechamento. D e E homogeneização no vortex e abertura do orifício na parte inferior do eppendorf. F e G encaixe do tubo para centrifugação e separação da secreção contida na escova citológica. H, I e J descarte do eppendorf que continha a secreção endocervical e ajuste do volume do tubo inferior contendo a secreção após a separação para o volume de 500 µL. K armazenamento do material processado a -80° C para análise. **Fonte:** Autor, 2017.

### 6.2.3 Quantificação das citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

As citocinas presentes na secreção endocervical foram dosadas por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) sanduíche onde foram utilizados pares de anticorpos monoclonais disponíveis comercialmente pela BD OptEIA™.

As placas utilizadas para as análises continham 384 poços com fundo chato e foram recobertas (sensibilizadas) com os anticorpos monoclonais específicos para a captura de cada citocina. Os poços correspondentes ao branco da reação não continham nenhuma concentração do antígeno (citocina) analisada.

Foram dosadas as concentrações das citocinas (IL-2, IL-12, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IL-6), e todos os procedimentos seguiram protocolos e normas técnicas fornecidas pelo fabricante como preparo das soluções tampão e lavagens, curvas padrões e incubações e, por fim, leitura no espectrofotômetro de acordo com a metodologia descrita abaixo.

#### 6.2.4 Metodologia para dosagens das citocinas

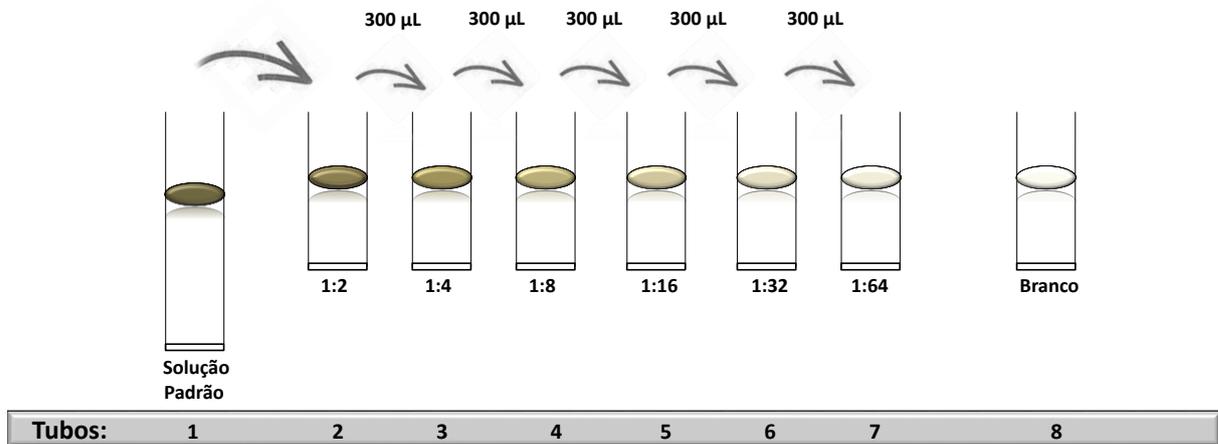
**a)** Antes da análise das secreções, cada placa foi sensibilizada com os respectivos anticorpos de captura correspondentes a cada citocina citada acima. Para esta sensibilização, foram pipetados 25 $\mu$ L do anticorpo de captura, diluídos na proporção (1:250) em solução tampão “Coating Buffer” (Carbonato de sódio - Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1M), obedecendo assim a recomendação especificada pelo fabricante e sendo suficientes para adsorver nos poços “Wells” da placa. Após esse procedimento cada placa foi incubada “overnight” a 4° C.

**b)** No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem “Wash Buffer” (PBS/Tween 20 a 0.05%) de forma a deixar os anticorpos aderidos nas superfícies de cada poço da placa.

**c)** Foram então pipetados 50 $\mu$ L em cada poço da placa de uma solução de bloqueio contendo proteína de alto peso molecular PBS/FBS (Soro Bovino Fetal 10%), com o objetivo de bloquear as áreas onde os anticorpos não aderiram na placa (sítios inespecíficos). A placa foi então tampada e incubada por 1 hora a temperatura ambiente.

**d)** Após este período de incubação, foi feita a lavagem da placa (PBS/Tween20 a 0.05%) 3 vezes; em seguida foram pipetados o padrão recombinante com concentração conhecida para cada citocina, sendo este previamente diluído seriadamente 1:2 em “Assay Diluente” (PBS/FBS-10%) para composição da curva padrão – **Figura 9**.

### Diluição Padrão



**Figura 9:** Diluição da solução padrão - Solução padrão diluída seriadamente em 300 µL de “Assay Diluente” (PBS/FBS- 10%) seguindo a ordem: Tubo 1 (solução preestabelecida com concentração inicial de cada citocina), Tubo 2 (diluição 1:2 da concentração inicial), Tubo 3 (diluição 1:4 da concentração inicial), tubo 4 (diluição 1:8 da concentração inicial), tubo 5 (diluição 1:16 da concentração inicial), tubo 6 (diluição 1:32 da concentração inicial), e tubo 7 (diluição 1:64 da concentração inicial). Tubo 8 contendo somente a solução diluente: 0pg/mL. **Fonte:** Autor, 2017.

**e)** As soluções padrão foram então pipetadas (25µL) nos oito primeiros poços da primeira fileira da placa. Em seguida, foram pipetados também 25µL das amostras seguindo a numeração de cada paciente bem como a ordem numérica das aplicações, totalizando 16 pacientes e tendo cada uma 6 amostras de secreção endocervical. Todas as amostras das pacientes foram pipetadas sequencialmente seguindo as ordens dos poços e fileiras da placa - **Figura 10**

**f)** Feito todo o plaqueamento (pipetagens – amostras e curva padrão), a placa foi então tampada e incubada por 2 horas em temperatura ambiente.

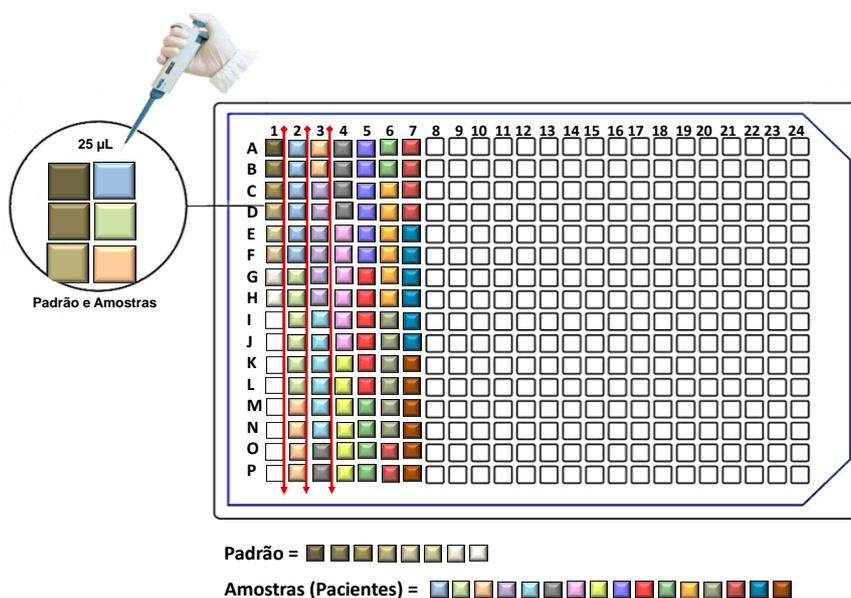
**g)** Após este período, a placa então lavada por 5 vezes (PBS/Tween20 a 0.05%) e foram pipetados a seguir 25µL de anticorpo de detecção (conjugado – Biotina/Streptavidina-HRP) diluído (PBS/FBS- 10%) específicos para cada citocina. Em seguida a placa foi mais uma vez tampada e incubada por 1 hora em temperatura ambiente.

**h)** Após 1 hora de incubação as placas foram lavadas 5 vezes (PBS/Tween20 a 0.05%) e em seguida foi realizado a reação de coloração, sendo pipetados 25µL do substrato cromógeno TMB (Tetramethylbenzidine) em cada poço da placa (padrões e amostras). Então a placa foi tampada e incubada mais uma vez por 30 minutos em local protegido da luz.

**i)** Passado esse período de incubação, foi adicionado 12,5µL de ácido fosfórico 1,0 M para interromper as reações.

**J)** A placa foi então analisada em um leitor de ELISA automático Spectramax384 Plus e os resultados foram obtidos pela diferença entre as absorvâncias 450 e 570 nm respectivamente.

**k)** As concentrações de cada citocina foram expressas em picogramas por mililitros (pg/mL) em cada amostra de secreção.



**Figura 10:** Placa de ELISA 384 demonstrando as disposições do experimento realizado para cada citocina dosada nas amostras das pacientes, bem como a disposição da curva padrão de cada citocina. Pacientes: (2A-2F:paciente-1), (2G-2L:paciente-2), (2M-3B:paciente-3), (3C-3H:paciente-4) e assim sucessivamente até completar todas as amostragens das 16 pacientes. Curva padrão: (1A-1H).  
**Fonte:** Autor ,2017.

### 6.2.5 Análise Estatística

Cada paciente foi identificada por números, sendo que a primeira paciente a participar do trabalho recebeu a identificação “1”, a segunda “2”, a terceira “3” e assim sucessivamente. Dessa forma, e como metodologia para análise estatística do estudo foram criados 3 grupos (Tabela 5) de acordo com os resultados histopatológicos (biópsias) no início e término do tratamento para comparação dos níveis das citocinas. As divisões dos grupos também obedeceram a critérios de regressão ou não da (s) lesão (ões) através de diagnósticos clínicos (videocoloscopia) no início e no término do tratamento.

**Tabela 4:** Metodologia dos grupos de estudo

<b>Grupos</b>	<b>Descrição da metodologia de estudo</b>	
Geral	Foram avaliados os níveis e perfis das citocinas nas respostas ao tratamento com interferon alfa 2b peguilado em todas as pacientes	16
Boa resposta	Avaliação dos níveis e perfis das citocinas das pacientes com Boa resposta terapêutica	7
Má resposta	Avaliação dos níveis e perfis das citocinas das pacientes com Má resposta terapêutica	9

Os resultados das citocinas obtidos nas secreções endocervicais dos grupos já mencionados foram avaliadas estatisticamente através do programa GraphPadPrism 6.0 e Microsoft Excel.

No caso das citocinas, em que os valores tiveram grandes variações foi utilizado teste não paramétrico (Friedman teste) seguido de teste Dunn para definir diferenças entre as aplicações durante o tratamento para os 3 grupos do estudo.

Diferenças existentes entre cada uma das aplicações foram avaliadas através do teste de Mann-Whitney, de acordo com a distribuição onde todos os resultados foram expressos em mediana e em valores máximo e mínimo, respectivamente.

Para a avaliação das tendências e regressão linear de cada citocina durante o período de tratamento, foi feito as médias de cada uma das citocinas durante o processo terapêutico das aplicações. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando “p” foi menor que 0,05 (5%).

## ***7—Resultados***

## 7.0 Resultados

### 7.1 – Resultados do Tratamento

No presente estudo, participaram um total de 16 mulheres encaminhadas pelo Ambulatório Maria da Glória para o tratamento com interferon  $\alpha$  2b peguilado (IFN- $\alpha$ ).

De acordo com o diagnóstico inicial, 18,75% (n=3) dessas pacientes apresentaram neoplasia intraepitelial cervical grau II (NIC II) e 81,25% (n=13) NIC III. Deste total, 43,75% (n=7) tiveram Boa resposta clínica após o tratamento com IFN- $\alpha$  e 56,25% (n=9) tiveram Má resposta (falha terapêutica).

Além dos dados clínicos e exames, foram também levantadas informações nos prontuários de cada paciente sobre hábitos, condições de vida e história pregressas pertinentes ao estudo, onde os dois grupos do estudo (Boa e Má respostas) apresentaram uma média de idades, abortos e 1ª relação sexual semelhantes, pode-se observar que no grupo com Má resposta, as pacientes apresentaram em média maiores números de paridade e gestação. Em contrapartida, as pacientes do grupo Boa resposta apresentaram um maior número de parceiros sexuais e uma idade mais avançada na primeira gestação, bem como em sua grande maioria faziam uso de anticoncepcionais orais (**Tabela 5**).

**Tabela 5:** Características gerais do estilo de vida e fatores de riscos convencionais dos grupos de estudo

Mediana ou Porcentagem		
Dados Gerais dos Grupos	Boa resposta	Má resposta
Idade (anos)	38	35
1ª relação sexual (anos)	17	17
Número de parceiros sexuais	4	2
1ª gestação (anos)	27	19
Número de gestações	1	2
Número de partos	1	3
Número de abortos	1	1
Uso de anticoncepcivo oral	85,71%	77,77%

**Tabela 5:** Dados das pacientes coletados durante o tratamento com interferon alfa 2b peguilado, segundo questionários e prontuários.

Como mencionado anteriormente, todos os diagnósticos clínicos, histopatológicos e condutas praticadas com cada uma das pacientes deste estudo podem ser observados nas tabelas 6 e 7.

**Tabela 6:** Características das pacientes que tiveram Boa resposta terapêutica ao tratamento com interferon alfa 2b peguilado

Paciente	Idade	Diagnóstico Pré-Tratamento	Diagnóstico Pós-tratamento	Conduta
2	47	NICIII/HPV	CC/MI <sup>1</sup>	Seguimento
3	54	NIC III	MEAI/HPV <sup>2</sup>	Seguimento
6	24	NIC III	HPV	Seguimento
9	42	NIC III	NIC II/HPV	CAF
10	38	NIC III	NIC II	Seguimento
15	36	NIC III	CCL/MEM <sup>3</sup>	Seguimento
16	34	NIC III	NIC II	Eletrocauterização

1 - Cervicite crônica/metaplasia imatura

2 - Mucosa escamosa com atipias de significado indeterminado, presentes alterações sugestivas de HPV

3 - Cervicite crônica leve, metaplasia escamosa madura.

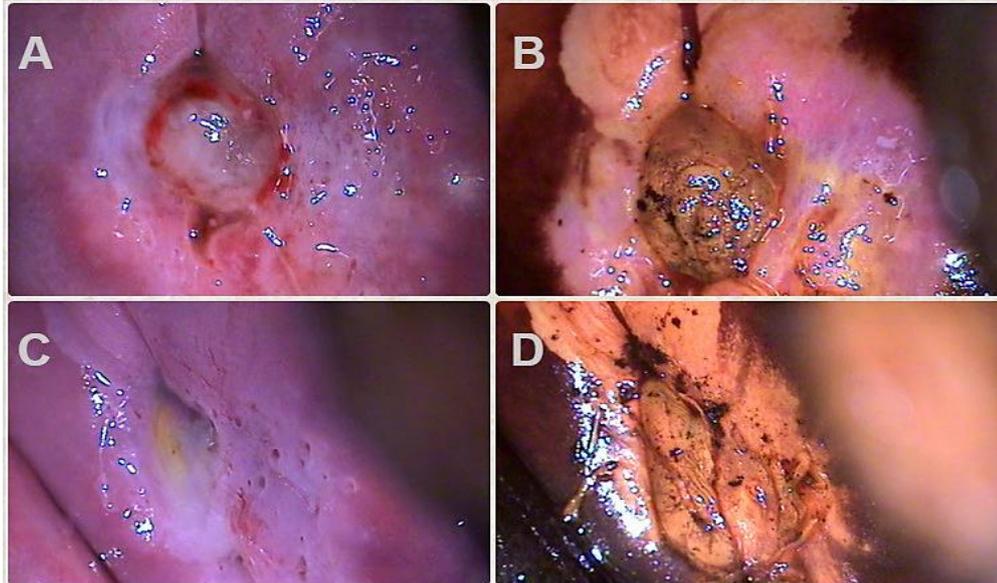
Os achados colposc6picos antes e depois do tratamento podem ser observados nas imagens de videocolposcopia obtidas de cada paciente na primeira e 6ltima aplica77o tendo com par6metro desaparecimento completo ou diminui77o do tamanho da les77o e ainda persist6ncia e/ou progress77o e aumento. Todos os procedimentos para esta an6lise seguiram normas e t6cnicas preestabelecidas e posteriormente foram confirmados por bi6psias (pranchas 1, 2, 3 e 4).

**Tabela 7:** Característica das pacientes que tiveram Má resposta terapêutica ao tratamento com interferon alfa 2b peguilado

Paciente	Idade	Diagnóstico Pré- Tratamento	Diagnóstico Pós-tratamento	Conduta
1	82	NIC III	NIC II/III	Coniza77o
4	65	NIC III	NIC III	Acompanhamento 6 meses
5	32	NIC III	NIC III	Coniza77o
7	34	NIC II	NIC II	Coniza77o
8	37	NIC II	NIC II	Eletrocauteriza77o
11	35	NIC III	NIC III	Coniza77o
12	35	NIC III	NIC III	Coniza77o
13	33	NIC III	NIC III/HPV	CAF
14	18	NIC II	NIC II	Eletrocauteriza77o

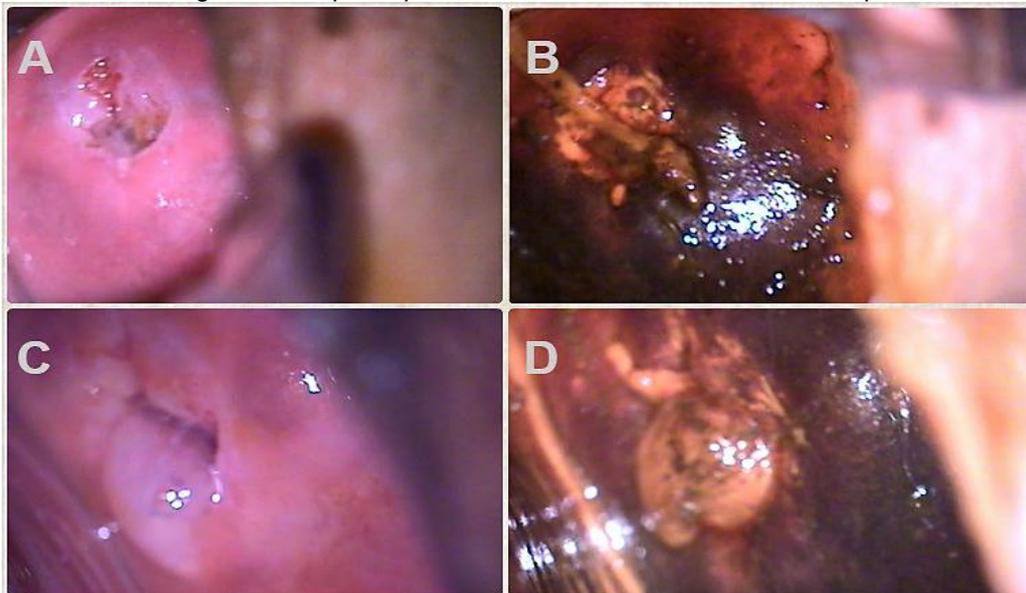
## 7.2 - Resultados da videocolposcopia das pacientes estudadas

**Prancha 1:** Imagens de colposcopia das lesões endocervicais antes e após o tratamento



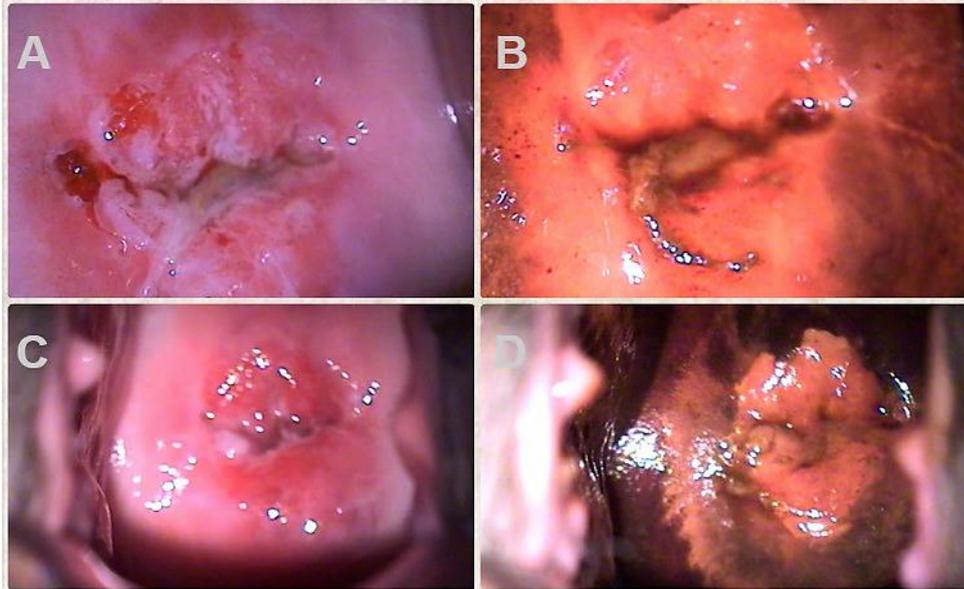
Imagens colposcópicas de Boa resposta terapêutica colhidas da Paciente 2 durante no início e término do tratamento com interferon alfa 2b peguilado. Início do tratamento A e B (teste de Schiller) e término do tratamento C e D (teste de Schiller). **Fonte:** Autor, 2017.

**Prancha 2:** Imagens de colposcopia das lesões endocervicais antes e após o tratamento



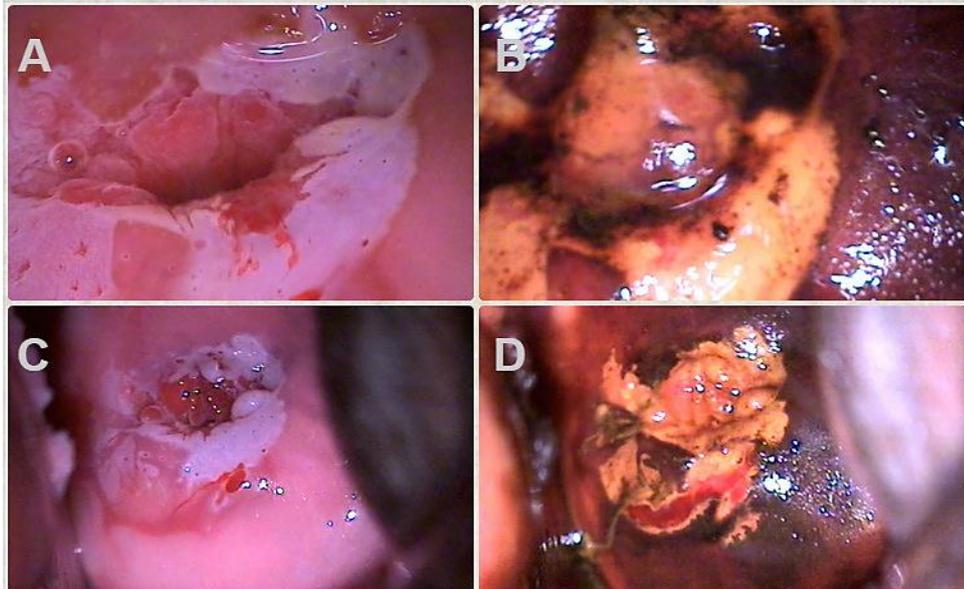
Imagens colposcópicas de Boa resposta terapêutica colhidas da Paciente 16 durante no início e término do tratamento com interferon alfa 2b peguilado. Início do tratamento A e B (teste de Schiller) e término do tratamento C e D (teste de Schiller). **Fonte:** Autor, 2017.

**Prancha 3:** Imagens de colposcopia das lesões endocervicais antes e após o tratamento



Imagens colposcópicas de Má resposta terapêutica colhidas da Paciente 5 durante no início e término do tratamento com interferon alfa 2b peguilado. Início do tratamento A e B (teste de Schiller) e término do tratamento C e D (teste de Schiller) **Fonte:** Autor, 2017.

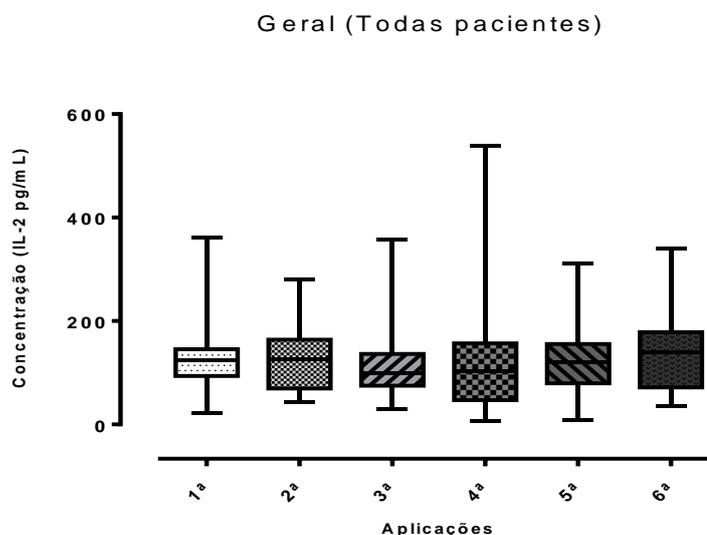
**Prancha 4:** Imagens de colposcopia das lesões endocervicais antes e após o tratamento



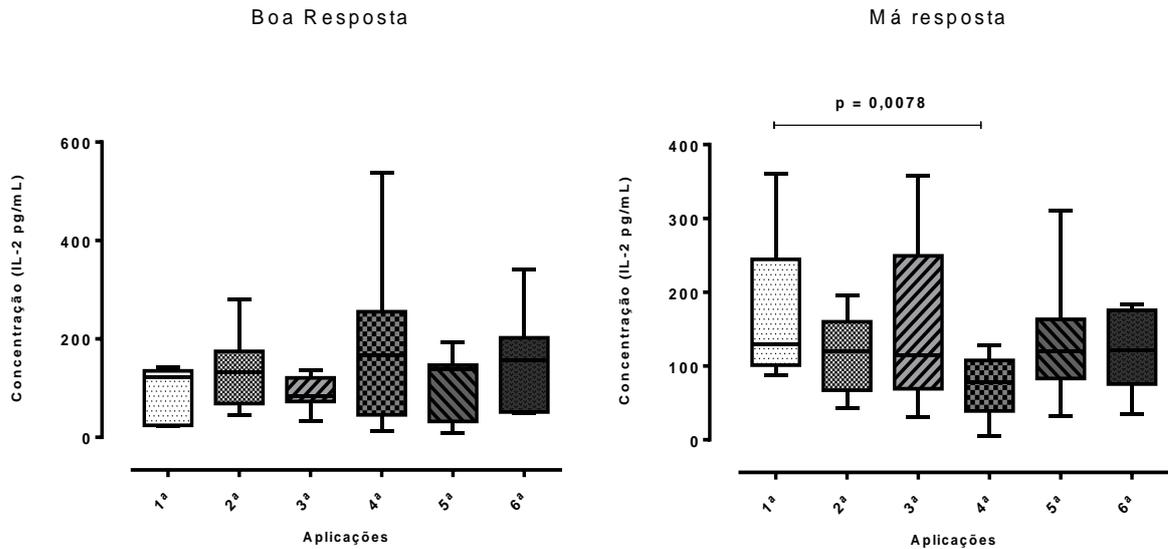
Imagens colposcópicas de Má resposta terapêutica colhidas da Paciente 8 durante no início e término do tratamento com interferon alfa 2b peguilado. Início do tratamento A e B (teste de Schiller) e término do tratamento C e D (teste de Schiller). **Fonte:** Autor, 2017.

### 7.3 - Avaliação das citocinas na secreção endocervical

Na avaliação geral de todas as pacientes, a citocina IL-2 não apresentou diferenças significativas durante o tratamento ( $p=0,8878$ , teste de Friedman) - Gráfico 1. Quanto aos grupos Boa e Má resposta, apesar de não termos observado significância ( $p=0,4414$  e  $0,3236$  respectivamente, teste de Friedman) pode-se perceber um pequeno aumento dessa citocina nas pacientes com Boa resposta durante as aplicações (Gráfico 2A). Fato contrário verificado com os pacientes que apresentaram Má resposta durante as quatro primeiras aplicações (Gráfico 2B). Ainda no grupo de pacientes com Má resposta terapêutica, foi verificada uma redução significativa da secreção desta citocina entre a 1ª e 4ª aplicação ( $p=0,0078$ , teste de Mann Whitney).

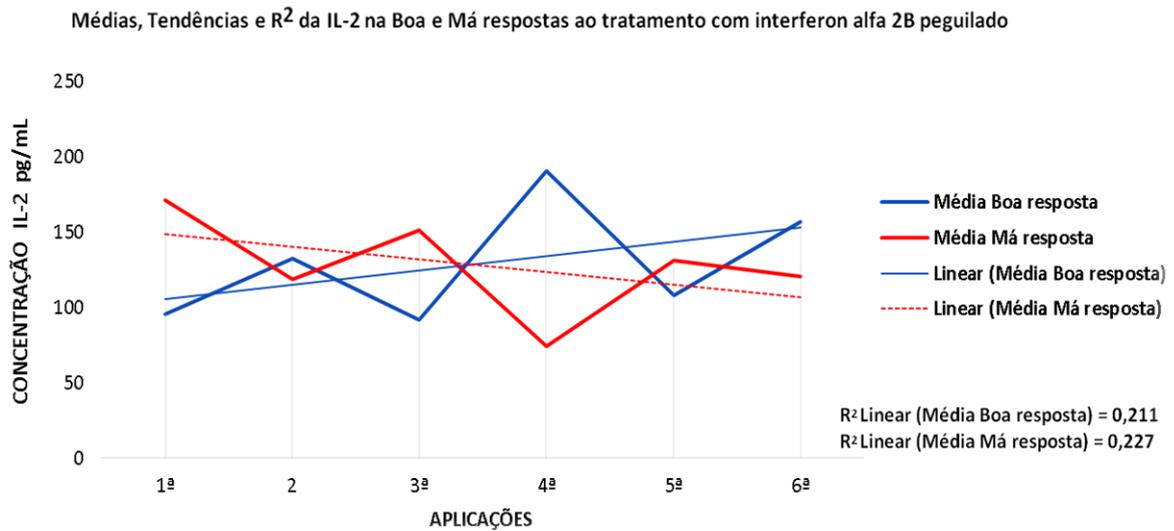


**Gráfico 1:** Gráfico da análise da concentração geral da citocina IL-2 em amostras de secreção endocervical, colhidas de todas as pacientes durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilhado ( $p=0,8878$ ; teste de Friedman).



**Gráfico 2:** A) Concentração de IL-2 em amostras de secreção endocervical, colhidas durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado, das pacientes que tiveram Boa resposta terapêutica ( $p=0,4414$ ; teste de Friedman). B) Concentração de IL-2 em amostras de secreção endocervical, colhidas durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado, das pacientes com Má resposta terapêutica ( $p=0,3236$ ; teste de Friedman) e 1ª e 4ª aplicações ( $p=0,0078$ ; teste de Mann-Whitney),  $P < 0.05$ .

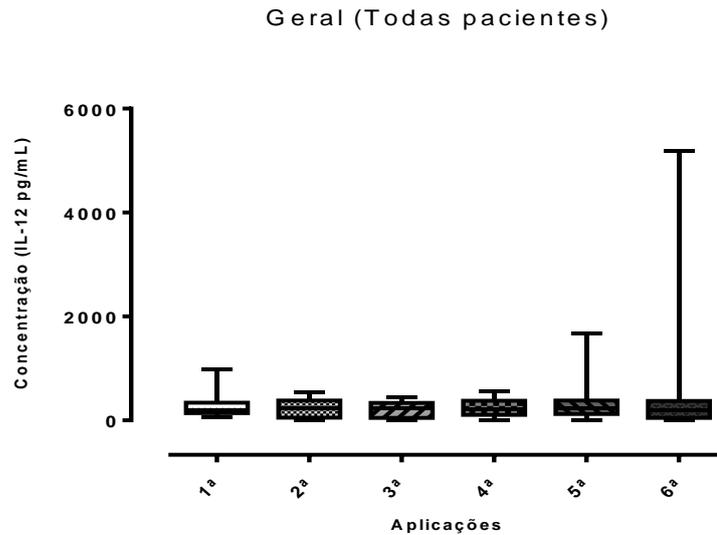
Este contraste entre as pacientes com Boa e Má resposta para a secreção de IL-2 pode ser verificado na avaliação das médias das aplicações durante o período de tratamento, bem como sua tendência durante a terapia. Além disso, resultados de regressão linear durante o período em questão demonstraram uma falta de relação entre os dois grupos. (Gráfico 3).



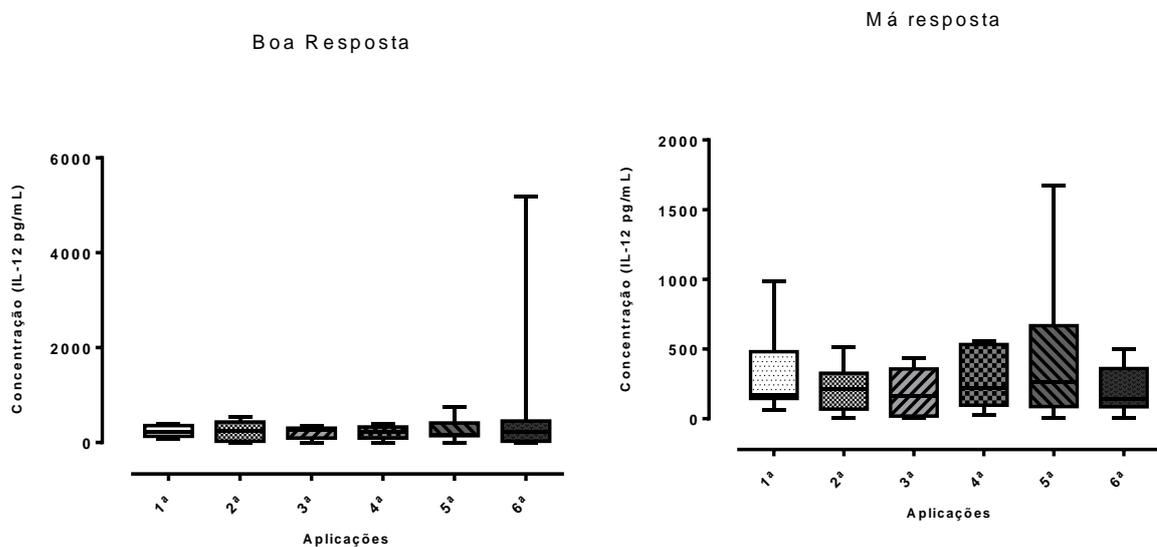
**Gráfico 3:** Gráfico das médias, regressão linear e tendência da IL-2 durante as aplicações de interferon alfa 2B peguilado nos grupos de pacientes com Boa e Má resposta ao tratamento.

Em relação à produção de IL-12, observou-se uma constância quando avaliada em todas as pacientes e também no grupo de Boa resposta terapêutica ( $p=0,9745$  e  $>0,9999$ ; teste de Friedman) (Gráficos 4 e 5A).

Em relação ao grupo de pacientes com Má resposta, as médias durante o tratamento mantiveram-se praticamente constantes, observando-se apenas uma pequena diminuição na última aplicação, mas sem significância estatística ( $p=0,9074$ ; teste de Friedman). Fato também observado quando se verifica a tendência desta citocina durante o tratamento (Figura 5B e 6). A regressão linear nas médias das pacientes com falha terapêutica demonstrou uma fraca correlação durante a terapia.

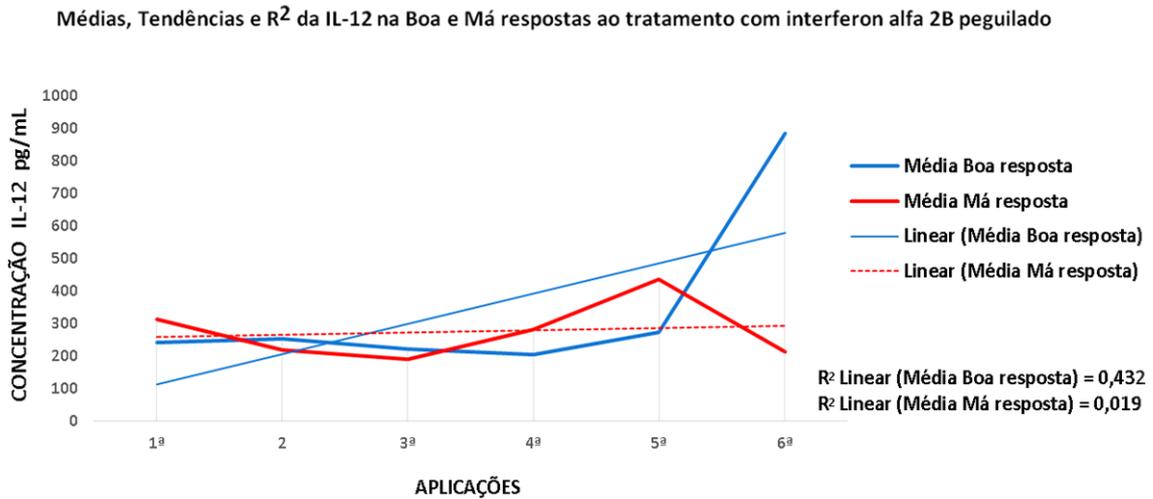


**Gráfico 4:** Gráfico da análise da concentração geral da citocina IL-12 em amostras de secreção endocervical, colhidas de todas as pacientes durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado ( $p=0,9745$ ; teste de Friedman).



**Gráfico 5:** A) Concentração de IL-12 em amostras de secreção endocervical, colhidas durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado, das pacientes que tiveram Boa resposta terapêutica ( $p=>0,9999$ ; teste de Friedman).

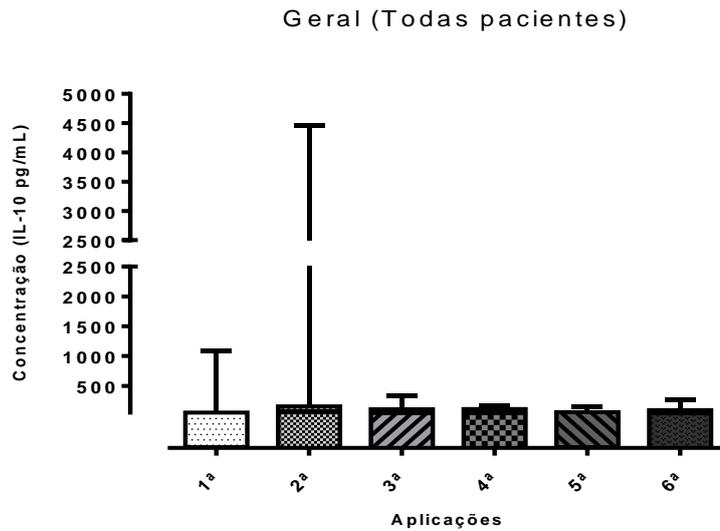
B) Concentração de IL-12 em amostras de secreção endocervical, colhidas durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado, das pacientes com Má resposta terapêutica ( $p=0,9074$ ; teste de Friedman).



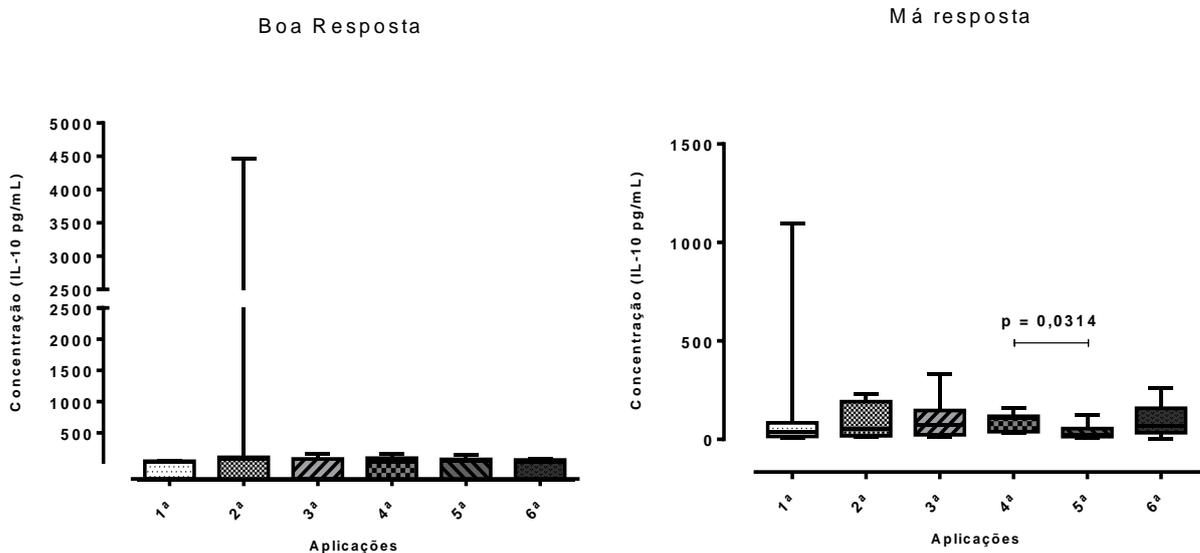
**Gráfico 6:** Gráfico das médias, regressão linear e tendência da IL-12 durante as aplicações de interferon alfa 2B peguilado nos grupos de pacientes com Boa e Má resposta ao tratamento

Na avaliação da IL-10 em todas as pacientes e também no grupo com Boa resposta terapêutica, as médias mantiveram-se praticamente regulares durante os períodos de aplicações, não sendo observadas diferenças significativas durante o tratamento ( $p=0,5041$  e  $0,4623$  respectivamente, teste de Friedman) (Gráfico 7 e 8A).

No grupo de pacientes com Má resposta, apesar de não ter havido diferença significativa para esta citocina de maneira geral ( $p=0,6755$ , teste de Friedman), foi observado seu aumento após o início do tratamento. Verificamos ainda, uma diminuição significativa, neste grupo, dos níveis da IL-10 entre a 4ª e 5ª aplicações ( $p=0,0314$ , teste de Mann Whitney), com aumento ao término do tratamento mantendo uma mediana semelhante ao início das aplicações. Fato esse observado na análise de suas médias onde também não observamos nenhuma correlação durante a terapia (Gráficos 8B e 9).

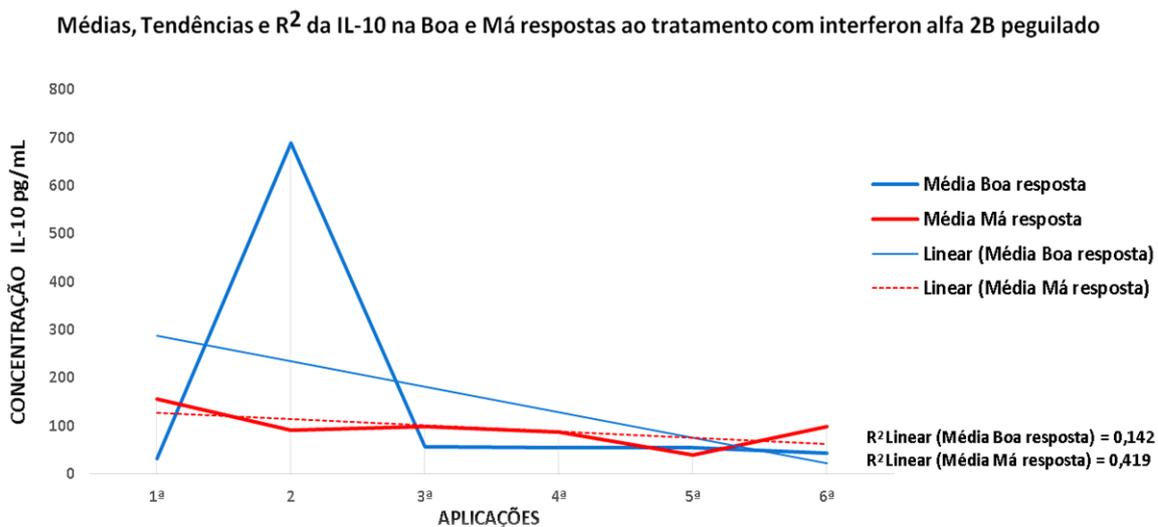


**Gráfico 7:** Gráfico da análise da concentração geral da citocina IL-10 em amostras de secreção endocervical, colhidas de todas as pacientes durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado ( $p=0,5041$ ; teste de Friedman).



**Gráfico 8:** A) Concentração de IL-10 em amostras de secreção endocervical, colhidas durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado, das pacientes que tiveram Boa resposta ( $p=0,4623$ ; teste de Friedman).

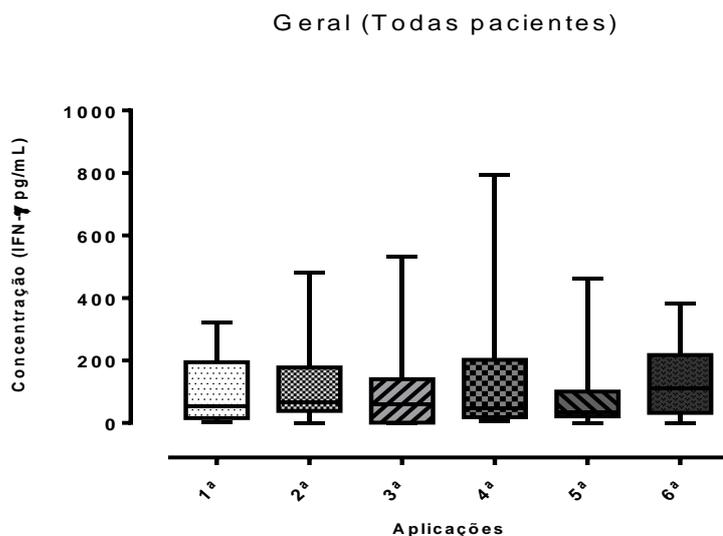
B) Concentração de IL-10 em amostras de secreção endocervical, colhidas durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado, das pacientes com Má resposta terapêutica ( $p=0,6755$ ; teste de Friedman) e 4ª e 5ª aplicação ( $p=0,0314$ ; teste de Mann Whitney),  $P < 0,05$ .



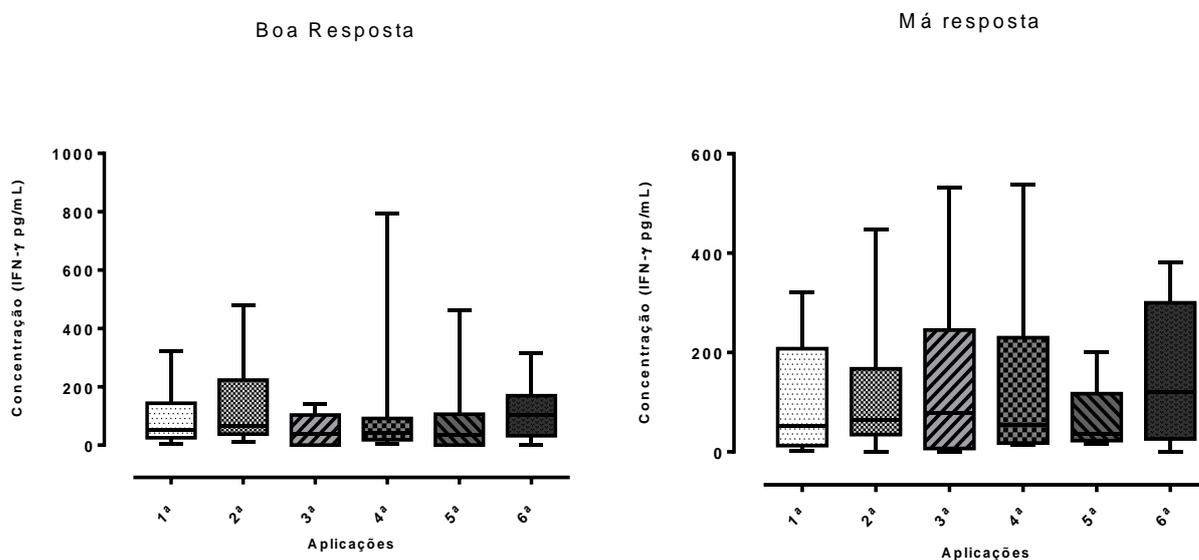
**gráfico 9:** Gráfico das médias, regressão linear e tendência da IL-10 durante as aplicações de interferon alfa 2B peguilado nos grupos de pacientes com Boa e Má resposta ao tratamento.

Quanto à avaliação do Interferon Gama (IFN- $\gamma$ ), esta citocina também não foi significativa em nenhum dos grupos avaliados tanto no número de amostras totais das pacientes ( $p=0,8989$ , teste de Friedman) como também naquelas pacientes com Má ( $p=0,9517$ , teste de Friedman) e Boa resposta ( $p=0,8648$ , teste de Friedman). Observamos somente um pequeno aumento em suas concentrações ao término do tratamento (Gráfico 10, 11A e 11B).

Esse pequeno aumento no final das aplicações, como também grandes variações sofridas durante o tratamento, pode ser observado quando se avalia as médias dessa citocina, bem como suas regressões lineares que apresentaram de um modo geral, baixa correlação nas pacientes com Boa e Má resposta durante as aplicações de interferon (Gráfico 12).

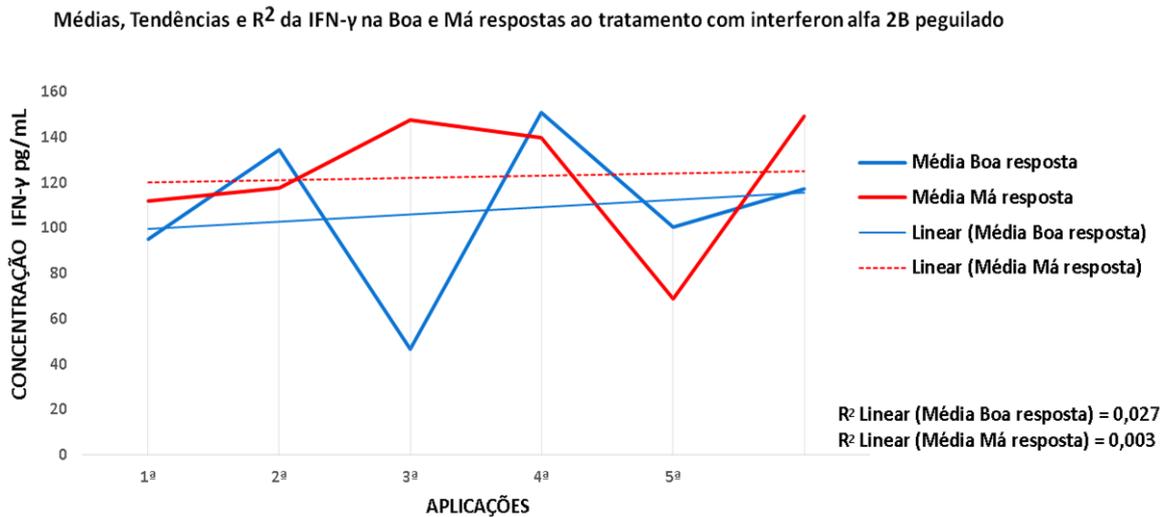


**Gráfico 10:** Gráfico da análise da concentração geral da citocina IFN- $\gamma$  em amostras de secreção endocervical, colhidas de todas as pacientes durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado ( $p=0,8989$ ; teste de Friedman).



**Gráfico 11:** A) Concentração de IFN- $\gamma$  em amostras de secreção endocervical, colhidas durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado, das pacientes que tiveram Boa resposta ( $p=0,8648$ ; teste de Friedman).

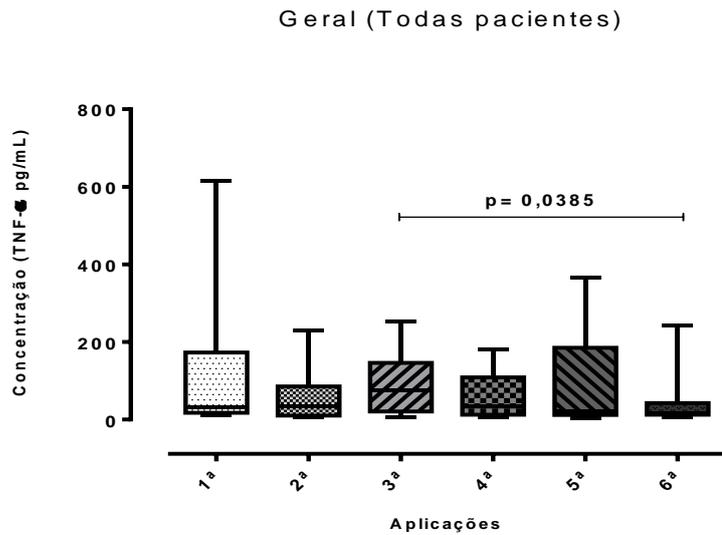
B) Concentração de IFN- $\gamma$  em amostras de secreção endocervical, colhidas durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado, das pacientes com Má resposta terapêutica ( $p=0,9517$ , teste de Friedman).



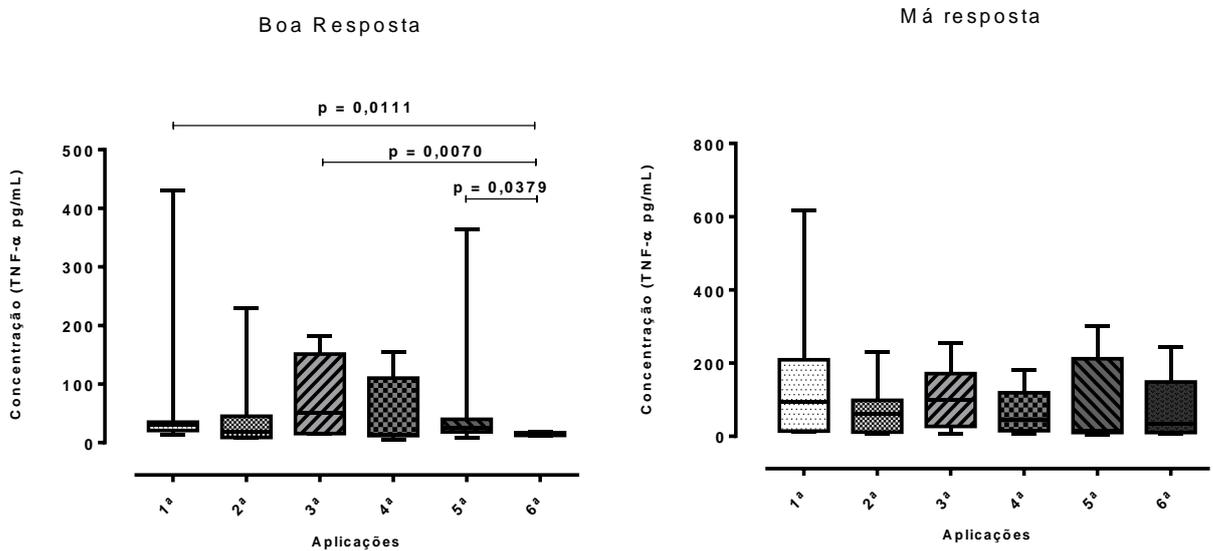
**Gráfico 12:** Gráfico das médias, regressão linear e tendência do IFN- $\gamma$  durante as aplicações de interferon alfa 2B peguilado nos grupos de pacientes com Boa e Má resposta ao tratamento.

Na avaliação geral da secreção de TNF- $\alpha$ , não houve diferença significativa no grupo total de pacientes do estudo ( $p=0,0666$ , teste de Friedman), mas observou-se uma redução significativa da secreção desta citocina quando comparadas a 3ª e 6ª aplicações ( $p=0,0385$ , teste de Mann Whitney) - Gráfico 13.

Nos grupos de Boa e Má respostas, a análise geral da secreção do TNF- $\alpha$  também não se mostrou significativa ( $p=0,1210$  e  $0,5426$  respectivamente, teste de Friedman). No entanto, observamos no grupo de Boa resposta terapêutica, diferenças significativas entre 1ª e 6ª, 3ª e 6ª e 5ª e 6ª aplicação ( $p=0,0111$ ,  $0,0070$  e  $0,0379$  respectivamente, teste de Mann Whitney), com diminuição em ambos os grupos, ao término do tratamento (Gráficos 14A e 14B). Essa diminuição no fim da terapia com interferon para esses grupos foi observada também na análise das médias e tendências ao longo das aplicações, sendo que não apresentaram correlação entre os períodos da terapia (Gráfico 15).

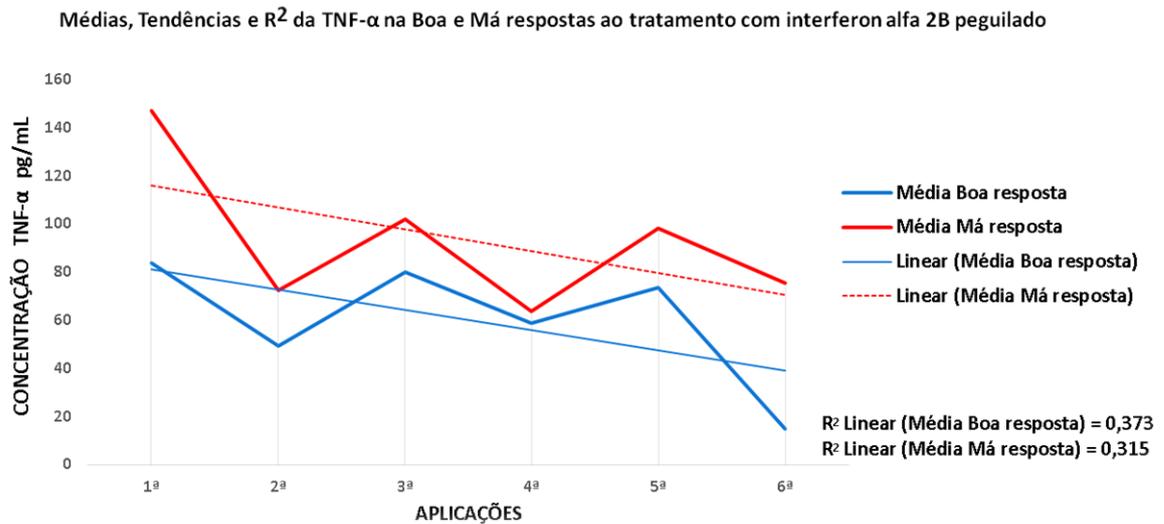


**Gráfico 13:** Gráfico da análise da concentração geral da citocina TNF- $\alpha$  em amostras de secreção endocervical, colhidas de todas as pacientes durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado ( $p=0,0666$ ; teste de Friedman) e 3ª e 6ª aplicações ( $p=0,0385$ ; teste de Mann Whitney),  $P < 0,05$ .



**Gráfico 14:** A) Concentração de TNF- $\alpha$  em amostras de secreção endocervical, colhidas durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado, das pacientes com Boa resposta terapêutica ( $p=0,1210$ ; teste de Friedman) e 1ª e 6ª, 2ª e 6ª e 4ª e 6ª aplicações ( $p=0,0111$ ,  $0,0070$  e  $0,0379$ ; teste de Mann Whitney),  $p < 0,05$ .

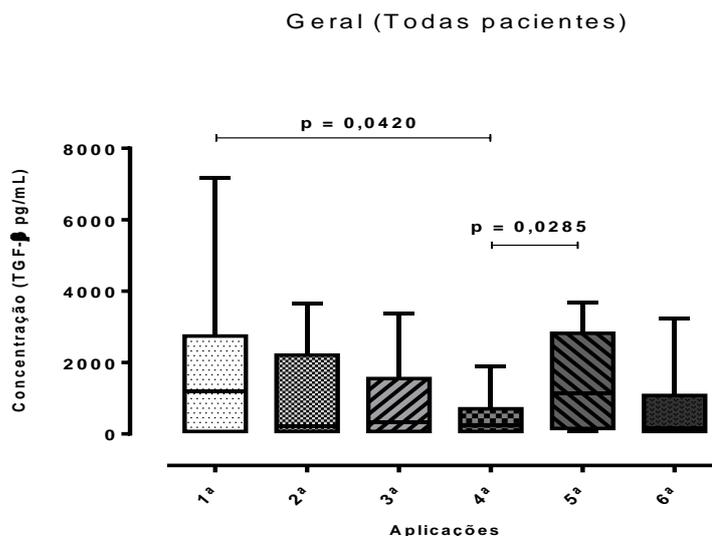
B) Concentração de TNF- $\alpha$  em amostras de secreção endocervical, colhidas durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado, das pacientes que tiveram Má resposta terapêutica ( $p=0,5426$ ; teste de Friedman).



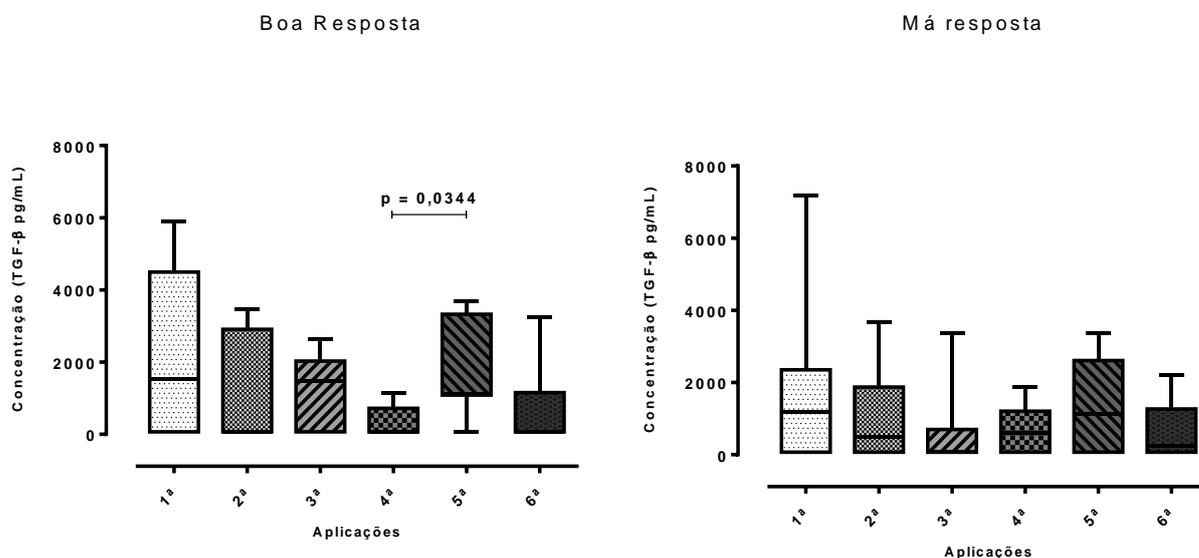
**Gráfico 15:** Gráfico das médias, regressão linear e tendência do TNF- $\alpha$  durante as aplicações de interferon alfa 2B peguilado nos grupos de pacientes com Boa e Má resposta ao tratamento.

A média geral da concentração do TGF- $\beta$  no estudo (Gráfico 16) mostrou-se significativa no grupo de pacientes em tratamento ( $p=0,0435$ , teste de Friedman) com diminuição moderada após o início das aplicações e aumento ao término da terapia. Também na avaliação de todas as pacientes, observamos diferenças significativas quando se compara a 1ª e 4ª e 4ª e 5ª aplicação ( $p=0,0420$  e  $0,0285$  respectivamente, teste de Mann Whitney).

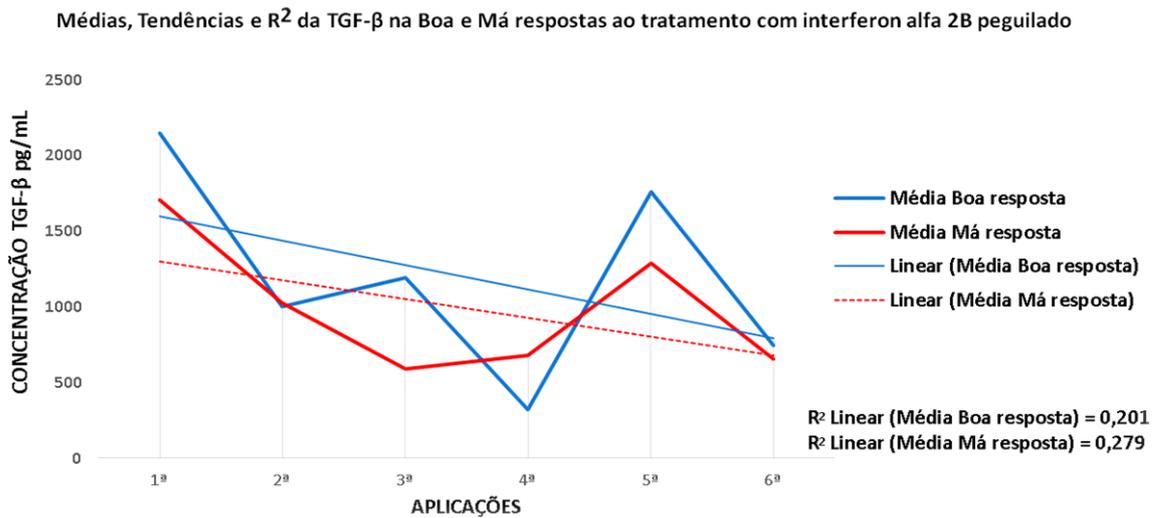
Nos grupos de pacientes com Boa e Má respostas (Gráficos 17A e 17B), apesar de não ter havido diferença significativa ( $p=0,1009$  e  $0,3034$ , teste de Friedman) verificamos também essa diminuição logo após o início do tratamento, com uma variação significativa no grupo Boa resposta entre 4ª e 5ª aplicação ( $p=0,0344$ , teste de Mann Whitney) – Gráfico 17A. Essa tendência de diminuição do TGF- $\beta$  observamos também na avaliação das médias desses grupos no período de tratamento, não sendo verificado porem, relação entre suas médias (Gráfico 18).



**Gráfico 16:** Gráfico da análise da concentração geral da citocina TGF-β em amostras de secreção endocervical, colhidas de todas as pacientes durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado, com teste estatístico significativo ( $p=0,0435$ ; teste de Friedman), 1ª e 4ª e 4ª e 5ª ( $p=0,0420$  e  $0,0285$ ; teste de Mann Whitney),  $P < 0.05$ .



**Gráfico 17:** A) Concentração de TGF-β em amostras de secreção endocervical, colhidas durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado, das pacientes que tiveram Boa resposta ( $p=0,1009$ ; teste de Friedman) e 4ª e 5ª aplicações ( $p=0,0344$ ; teste de Mann Whitney),  $p < 0,05$ . B) Concentração de TGF-β em amostras de secreção vaginal, colhidas durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado; das pacientes com Má resposta terapêutica ( $p=0,3034$  teste de Friedman).



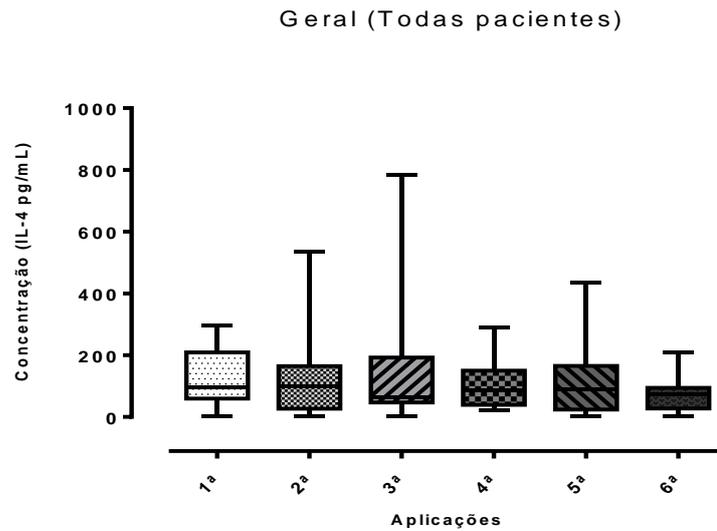
**Gráfico 18:** Gráfico das médias, regressão linear e tendência do TGF- $\beta$  durante as aplicações de interferon alfa 2B peguilado nos grupos de pacientes com Boa e Má resposta ao tratamento

Na análise das concentrações de IL-4 em todas as pacientes do estudo, não houve diferenças significativas a serem atribuídas ( $p=0,6087$ , teste de Friedman) - Gráfico 19.

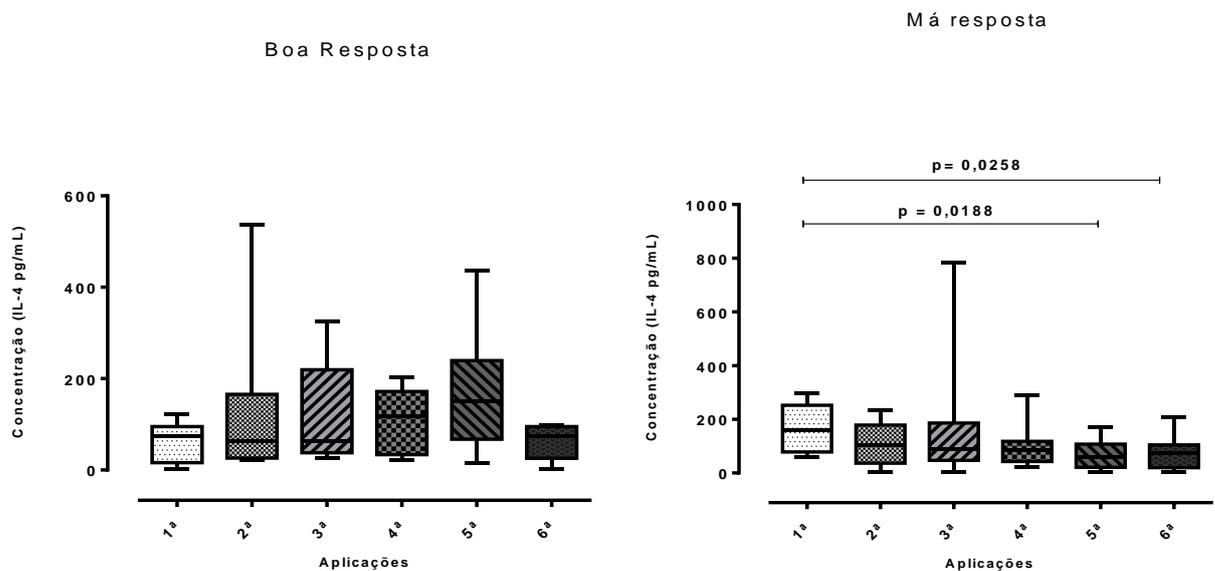
No entanto, apesar de também não apresentar resultados significativos ( $p=0,5062$ , teste de Friedman) para o grupo de Boa resposta, esta citocina revelou um aumento após o início das aplicações com aumento das concentrações médias na quarta e quinta aplicação, mas diminuição ao final da terapia (Gráfico 20A).

Já no grupo de pacientes com Má resposta, verificamos dados significantes ( $p=0,0493$ , teste de Friedman) com uma diminuição ao longo do tratamento. Fato significativamente confirmado analisando a 1ª com a 5ª e 6ª aplicações ( $p=0,0188$  e  $0,0258$ , teste de Mann Whitney) – Gráfico 20B.

Essa diminuição durante o tratamento para as pacientes com falha terapêutica pode ainda ser observada ao avaliar suas médias e tendência durante as aplicações no tratamento, onde podemos ainda inferir de certa maneira uma boa correlação entre suas médias na terapia, sendo fato contrário, verificado na Boa resposta (Gráfico 21).

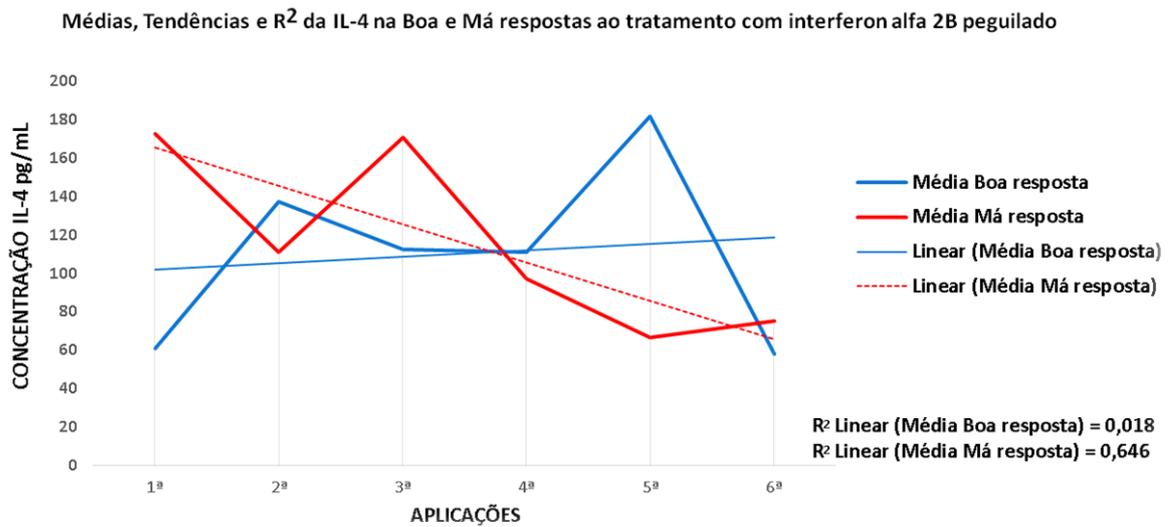


**Gráfico 19:** Gráfico da análise da concentração geral da citocina de IL-4 em amostras de secreção endocervical, colhidas de todas as pacientes durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado ( $p=0,6087$ ; teste de Friedman).



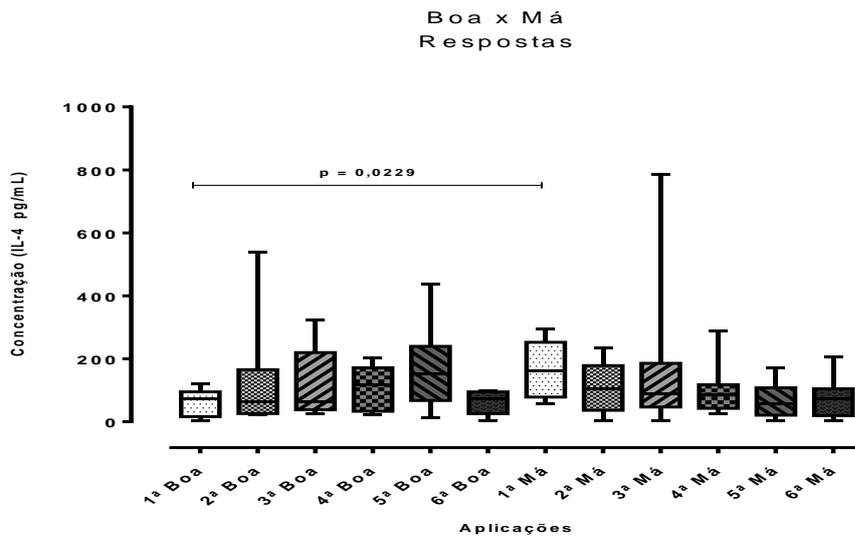
**Gráfico 20:** A) Concentração de IL-4 em amostras de secreção endocervical, colhidas durante o tratamento com interferon alfa2b peguilado, das pacientes que tiveram Boa resposta ( $p=0,5062$ ; teste de Friedman).

B) Concentração de IL-4 em amostras de secreção endocervical, colhidas durante o tratamento com interferon alfa 2b peguilado, das pacientes com Má resposta terapêutica ( $p=0,0493$ ; teste de Friedman), 1ª e 5ª e 1ª e 6ª aplicação ( $p=0,0188$  e  $0,0258$ ; teste de Mann Whitney),  $p < 0,05$ .



**Gráfico 21:** Gráfico das médias, regressão linear e tendência da IL-4 durante as aplicações de interferon alfa 2B peguilado nos grupos de pacientes com Boa e Má respostas ao tratamento

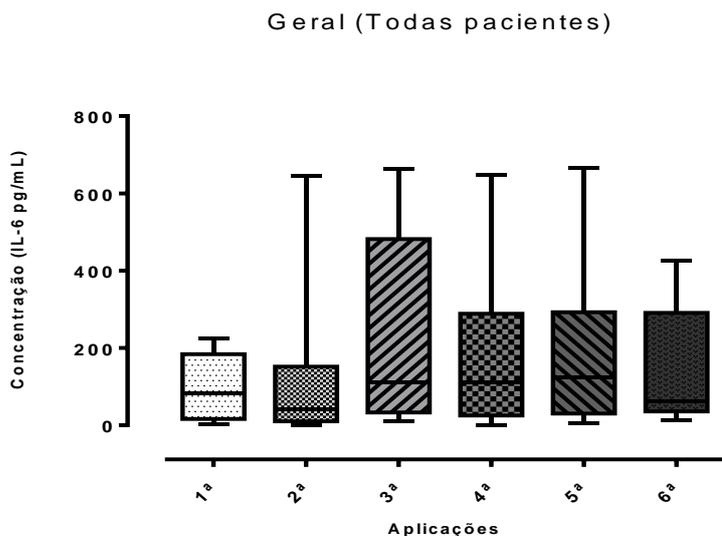
Ainda em relação à citocina IL-4, esta foi a única citocina que apresentou significância estatística quando foram comparados os grupos Boa e Má respostas entre si durante os tempos de aplicação do interferon  $\alpha$  2b peguilado (Gráfico 22). Houve diferença significativa ( $p=0,0229$ , teste de Mann Whitney) no início das aplicações, mostrando-se aumentada naquelas pacientes com Má resposta quando comparada ao grupo de Boa resposta. Fato esse, verificado também quando se observamos suas médias nas aplicações (Gráfico 21).



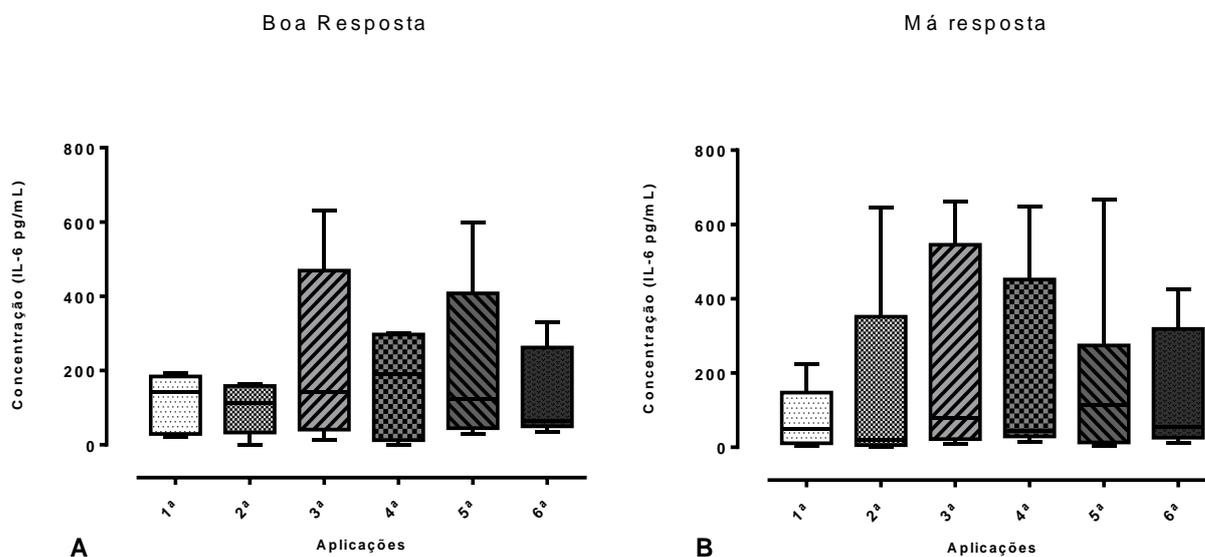
**Gráfico 22:** Gráfico da análise das concentrações de IL-4, comparadas entre os grupos Boa e Má resposta durante os períodos de tratamento das pacientes com interferon alfa 2B peguilado ( $p=0,0229$ ; teste de Mann Whitney),  $p < 0,05$ .

Em relação a IL-6 observamos um aumento nos grupos estudados, principalmente naquelas pacientes com falha terapêutica, porém sem variação significativa ( $p=0,0783$ ,  $0,5290$  e  $0,1876$ , teste de Friedman) - Gráficos 23, 24 A e B.

Observamos ainda, que suas concentrações médias diminuem com o término do tratamento para os grupos Boa e Má respostas, apesar de haver uma tendência de crescimento para esses grupos ao final da terapia, mas sem dados correlativos (Gráfico 25).

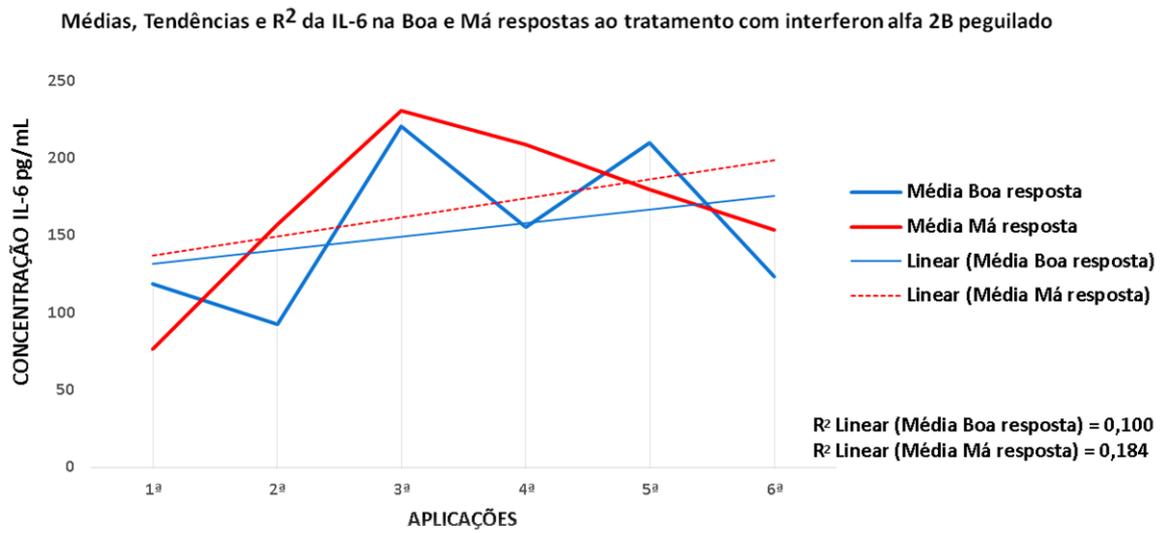


**Gráfico 23:** Gráfico da análise da concentração geral da citocina de IL-6 em amostras de secreção endocervical, colhidas de todas as pacientes durante o tratamento com interferon alfa 2B peguilado ( $p=0,0783$ ; teste de Friedman).



**Gráfico 24:** A) Concentração de IL-6 em amostras de secreção endocervical, colhidas durante o tratamento com interferon alfa 2bpeguilado, das pacientes que tiveram Boa resposta terapêutica ( $p=0,5290$ ; teste de Friedman).

B) Concentração de IL-6 em amostras de secreção endocervical, colhidas durante o tratamento com interferon alfa 2bpeguilado, das pacientes com Má resposta terapêutica ( $p=0,1876$ ; teste de Friedman).



**Gráfico 25:** Gráfico das médias, regressão linear e tendência da IL-6 durante as aplicações de interferon alfa 2B peguilado nos grupos de pacientes com Boa e Má resposta ao tratamento

## ***8 – Discussão***

## 8.0- DISCUSSÃO

A infecção pelo HPV no colo do útero é o principal precursor de uma série de eventos pertinentes que levam ao CC; fato este documentado em diversos estudos epidemiológicos e experimentais ao longo dos anos (BEGLIN; MELAR-NEW; LAIMINS, 2009; BONNER et al., 2010; LABANI; ASTHANA, 2014; LONGWORTH; LAIMINS, 2004; MICHELIN et al., 2015; MISSON et al., 2011; SHARMA A, RAJAPPA M, SAXENA A, 2007; WRIGHT et al., 1994).

Tratamentos alternativos como a imunoterapia com interferon já foram descritos com sucesso por proporcionar grandes vantagens como a preservação do colo uterino e do futuro reprodutivo de pacientes com lesões de alto grau (MURTA, E.F.C.; TAVARES MURTA, 2004; PENNA et al., 1994), como também no tratamento de outras doenças tais como leucemias e carcinomas renais (BEX A, MALLO H, KERST M, HAANEN J, HORENBLAS S, 2005; GEORGE et al., 2008; GRESSER I, FONTAINE D, COPPEY J, FALCOFF R, 1967).

O sistema imune, em especial o sistema imune local do trato genital, é importante no combate das infecções causadas pelo HPV, principalmente aquelas relacionadas com as neoplasias do colo do útero, pois as citocinas regulam a resposta imunológica de várias maneiras.

Sabendo disso, uso do interferon intralesional foi demonstrado recentemente pelo nosso grupo de estudo no IPON (Instituto de Pesquisa em Oncologia) diminuir a carga viral do HPV e promover uma boa resposta clínica em aproximadamente 40 a 60% das pacientes com neoplasia intraepitelial (MACHADO, 2011; MARDEGAN, 2008; RAMOS, 2009). A peguilação de diversas substâncias e fármacos, tem se tornado uma fonte de tratamento eficaz de várias doenças aumentando a meia vida terapêutica e proporcionando maior comodidade aos pacientes. Um trabalho utilizando lipossomas peguilados como agente antineoplásico mostrou eficácia, agindo como modulador de apoptose/ autofagia e

aumento da citotoxicidade contra células HeLa de câncer do colo do útero (JUANG; LEE; LIN, 2016; LO YL, 2015)

Porém, na literatura trabalhos com IFN- $\alpha$  peguado no tratamento de neoplasias ginecológicas não são descritos. Neste trabalho, nós encontramos uma boa resposta terapêutica em 43,75% das pacientes, dado este que está de acordo com outros estudos que utilizaram o interferon intralesional como forma terapêutica e demonstraram uma cura ou estabilização da neoplasia variando 33% a 90% das pacientes (GERMANO et al., 1989; RAMOS, 2009; MACHADO, 2011; STELLATO, 1992).

Apesar de o tabagismo ter sido um fator de exclusão para o tratamento, os resultados encontrados em nosso estudo estão de acordo com a maioria dos trabalhos apresentados pela literatura no que diz respeito aos riscos convencionais (Tabela 4) para aquisição e desenvolvimento do CC. Somente aquelas pacientes com Boa resposta apresentaram um maior número de parceiros sexuais, fato que contradiz muitos estudos também citados na mesma tabela.

As citocinas são moléculas de grande importância na resposta imunológica eficiente contra inúmeros patógenos intracelulares (SCOTT et al., 2006) e em nosso trabalho encontramos diferentes respostas ao longo do tratamento com IFN-peg.

Observamos, em nosso estudo, um pequeno aumento da IL-2 naquelas pacientes com Boa resposta, com diminuição significativa naquelas com falha terapêutica (Gráfico -2B). Ramos e colaboradores (2009) e Mardegan e colaboradores (2008) observaram esse mesmo padrão para aquelas pacientes com falha tratadas com interferon intralesional, fazendo reforçar a ideia que nessas pacientes ocorrem uma de perda da função imune, já que baixas concentrações de IL-2 podem promover um microambiente regulatório ao crescimento tumoral (VALLE-MENDIOLA et al., 2016).

Além disso, células infectadas pelo HPV possuem receptores de IL-2 compostos como parte de um mecanismo autócrino e em baixas concentrações

dessa citocina aumentam a fosforilação dessa via de sinalização estimulando a proliferação celular, sendo ainda que receptor pode ser ativado alternativamente na ausência de IL-2 (ROCHA-ZAVALETA et al., 2004).

No mesmo trabalho citado acima, Ramos analisa a expressão de citocinas por mRNA em amostras de biópsias de pacientes tratadas com interferon  $\alpha$  intralesional, verificou que aquelas pacientes com Boa resposta expressaram IL-2 após a terapia, sugerindo que essa citocina pode ter bloqueado o crescimento de queratinócitos infectados pelo HPV e dessa forma, inibindo a expressão de oncoproteínas virais, promovendo assim a regressão da lesão de alto grau, já que trabalhos têm demonstrado uma inibição do crescimento de CC por tratamento com concentrações elevadas de IL-2 (CASANA; HERNANDEZ; ARANA, 2002). Além disso, em um ambiente com baixas concentrações dessa citocina ocorre um aumento da fosforilação constitutiva de JAK3 e STAT5 em células tumorais e diminui nos linfócitos, enquanto que o oposto ocorre em doses elevadas de IL-2 (VALLE-MENDIOLA et al., 2014).

Em um dos estudos pioneiros sobre esta interleucina, Tsukui e colaboradores 1996 demonstraram que a produção in vitro de IL-2 por linfócitos periféricos, que responderam aos peptídeos derivados do HPV, esteve diminuída em mulheres com lesões de baixo e alto grau, fato observado em nosso estudo durante o tratamento daquelas pacientes que não responderam a terapia. Sobre esta ótica, vários estudos vem utilizando esta citocina como potencializadora de respostas ao HPV, sendo observado um efeito antitumoral forte e protetor, bem como uma maior geração de células TCD8<sup>+</sup> específicas para E7 do vírus (LIN et al., 2007).

Nesse estudo os níveis de IL-12 não apresentaram significância, somente uma tendência elevada naquelas pacientes com Boa resposta clínica, mesmo perfil evidenciado por Machado e colaboradores (2011) analisando o infiltrado de células no estroma do colo uterino em pacientes com neoplasia de alto grau tratadas com interferon 2b intralesional. Outro trabalho avaliando os níveis séricos dessa citocina em pacientes submetidas ao mesmo tratamento, Ribeiro e seus colaboradores (2010) observaram um aumento significativo naquelas pacientes que obtiveram

resposta positiva demonstrando talvez uma repolarização do perfil imunológico (TH2/TH1) já que esta é uma das características dessa citocina em ambiente tumoral, por possuir atividade imunomoduladora e antiangiogênica, por isso ela pode ser usada para tratamentos imunoterápicos contra vários tipos de cânceres (WESA et al., 2007).

A família da IL-12 ativa fatores-chaves na regulação de respostas celulares que são orquestradas por monócitos, macrófagos e células dendríticas essenciais para resposta imune específica (GEE K, GUZZO C, CHE MAT NF, MA W, 2009). Uma diminuição da atividade de células dendríticas, devido à baixa produção de TNF e IL-1 pode ser devido a uma reduzida expressão do mRNA mensageiro da IL-12 em pacientes com carcinoma cervical associado a infecção pelo HPV (PETERS et al., 1996).

Outro estudo utilizando a proteína E2 do HPV como promotor específico da expressão de atividade da IL-12, demonstrou atividade funcional *in vitro* e *in vivo*, com capacidade de inibir significativamente o crescimento do tumor em um modelo de tumor de HPV 16, porém a sua produção por células dendríticas depende de outros fatores como GM-CSF, TNF- $\alpha$  e IL-1 que, por sua vez, encontram-se diminuídos no carcinoma cervical (WOODWORTH & SIMPSON, 1993). Vários trabalhos anteriores têm procurado usar esta citocina como uma fonte de resposta TH1 promissora contra o câncer; contudo ensaios clínicos não foram bem-sucedidos devido a efeitos secundários de toxicidade (HUANG et al., 2016; WEI et al., 2013).

Os mecanismos pelos quais as células regulam ou inibem a resposta imune ainda são fontes de aprendizados em diversos segmentos de pesquisa. A IL-10 é uma citocina necessária para funções de células T auxiliares, a vigilância imunológica das células T e a supressão da inflamação associada ao câncer (DENNIS et al., 2015). As variações da IL-10 em nosso trabalho não apresentaram grandes variações entre os grupos sendo observado somente um pequeno aumento significativo naquelas pacientes com Má resposta (Gráfico 8B) e tendência também aumentada ao término do tratamento. Aumento este verificado por Mardegan e colaboradores (2008) nas concentrações iniciais dessa citocina quando avalia-se a

resposta imune local das pacientes com falha terapêutica após o tratamento com interferon intralesional, sugerindo que este panorama pode estar relacionado com a falha terapêutica.

Na avaliação do estroma cervical em pacientes com lesões de alto grau Ramos (2009), observou ausência na expressão de mRNA para IL-10 em todas as pacientes, antes e após o tratamento com interferon intralesional. Outro estudo realizado por Marcolino e colaboradores (2011) avaliou os níveis de IL-10 na secreção cervical e foi observado um grande aumento, e que esta citocina apresentava níveis significativamente elevados naquelas pacientes com carcinoma epidermóide invasor, demonstrando que a concentração dessa citocina aumentara significativamente com a gravidade da displasia porém não se tratavam com interferon (GIANNINI et al., 1998; CLERICI et al., 1997). Em desacordo com este achado, a diminuição da expressão da IL-10 e o aumento da expressão de FoxP3, foi observado em pacientes com NIC II e NIC III (SCOTT et al., 2009).

Trabalhos prévios também encontraram aumento da expressão de IL-10 em diferentes estágios da infecção pelo HPV, sendo sugerido pelos autores tal fato como um mecanismo de escape de queratinócitos cervicais pré-neoplásicos, uma vez que a IL-10 é uma potente citocina imunossupressora, que inibe a ativação das células T e a diferenciação das células TH1 (MINDIOLA R, CAULEJAS D, NÚÑEZ-TROCONIS J, ARAUJO M, DELGADO M, 2008), além disso, esta citocina possui capacidade de inibir funções de macrófagos ativados, além de inibir a expressão de moléculas MHC classe II em macrófagos o que, por sua vez, diminui a ativação de células T e a imunidade mediada por células (ABBAS; LICHTMAN; PLLAI, 2012).

O IFN- $\gamma$  é uma das principais citocinas do padrão TH1 produzido pelas células circulantes, e são de grande importância no combate ao HPV bem como sua persistência, pois estudos levantam a hipótese de que a persistência viral estaria associada à falha em expressar e manter esse padrão de resposta imune (SCOTT et al., 1999), estando talvez este fato diretamente relacionado com o desenvolvimento de neoplasias. Em nosso trabalho não encontramos significância para esta citocina em nenhum dos grupos estudados, apenas sendo observado uma pequena

tendência de aumento no término do tratamento para os grupos Boa e Má respostas. Estes resultados estão de acordo com o estudo realizado por Marcolino e colaboradores (2011) onde foi avaliado o perfil de citocinas em mulheres com HSIL, LSIL e carcinoma epidermóide invasor.

Talvez esse pequeno aumento ao término da terapia encontrado neste trabalho explique ao fato de que Ramos e colaboradores (2009) observam a expressão de IFN- $\gamma$  somente no final do tratamento naquelas pacientes que responderam à terapia com interferon intralesional, sugerindo que talvez o IFN- $\gamma$  poderia ter bloqueado o crescimento dos queratinócitos infectados pelo HPV, com consequente inibição das oncoproteínas virais; promovendo assim a regressão das lesões de alto grau.

Fato contrário foi observado por Mardegan e colaboradores (2008), sendo encontrados níveis baixos tanto nas pacientes que tiveram falha como nas que responderam ao tratamento, sendo inferido que esse decréscimo do IFN- $\gamma$  se dá em conjunto com outras citocinas do perfil TH1 nas lesões de alto grau, tendo em vista que todas as pacientes tinham esse diagnóstico. Este fato é também observado por outros autores sugerindo talvez que as proteínas E6 e E7 do HPV 16 e 18 inibem especificamente a expressão e sinalização do IFN- $\gamma$ , e permitindo assim que o vírus escape da resposta antiviral (KOROMILAS; LI; MATLASHEWSKI, 2001), sendo verificado talvez que por essa baixa expressão de IFN- $\gamma$  que ocorra uma persistência do HPV por falha em expressar citocinas Th1 (SCOTT et al.,1999).

Em outro estudo prévio, Song e colaboradores (2008) analisaram cortes histológicos de lesões de baixo grau por PCR em tempo real e sugeriram que o IFN- $\gamma$  intralesional pode ser considerado marcador para *clearance* do HPV de alto risco após 12 meses de acompanhamento.

TNF- $\alpha$  possui importante atuação nas reações inflamatórias induzindo secreção de citocinas por diversas células da imunidade inata e adaptativa, além de inibir a expressão dos genes E6 e E7 do HPV (AGARRWAL BB, 2003; SCOTT; 2014). No presente trabalho, a avaliação dessa citocina apresentou níveis baixos naquelas pacientes com Boa resposta com diminuições estatisticamente relevantes

ao longo do tratamento, tanto para esse grupo quanto na análise de todas as pacientes nos períodos da terapia (Gráficos 13 e 14A). Este fato, porém, parece ter sido observado por Ramos e colaboradores (2009) quando avaliam a expressão dessa citocina nas pacientes com resposta terapêutica, onde foi verificado ausência de mRNA do TNF- $\alpha$  antes do tratamento com IFN -2b intralesional. Porém, em nosso trabalho os níveis dessa citocina continuam baixos ao término da terapia, ao contrário na expressão de mRNA do TNF- $\alpha$  observada por Ramos (2009).

Um estudo realizado por Gaiotti e colaboradores (2000) relacionou o TNF- $\alpha$  com a ativação de *RAS* e promovendo a expressão do RNA de oncoproteínas E6 e E7, estimulando dessa maneira o crescimento de queratinócitos imortalizados. Este fato talvez explique níveis baixos dessa citocina naquelas pacientes com Boa resposta. Outro trabalho avaliou os efeitos do Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  em culturas de queratinócitos de prepúcio normais e humanos imortalizados com HPV (16 e 18) e foi verificado que os queratinócitos primários e imunizados com HPV-16 eram sensíveis ao TNF- $\alpha$ , enquanto aqueles imortalizados com HPV-18 eram resistentes aos efeitos inibitórios desta citocina (VILLA et al., 1992).

Mardegan e colaboradores (2008), também encontrou baixos níveis dessa citocina em secreções vaginais, fazendo reforçar a ideia de que ocorre decréscimo do perfil TH1 nas lesões de alto grau. Além disso, altos níveis de TNF- $\alpha$  (AZAR et al., 2004), bem como variações no gene de seus receptores (SINGHAL et al., 2016) podem estar relacionados com neoplasia intraepitelial cervical. Outro estudo relaciona esta citocina interferindo diretamente na expressão de proteínas reguladoras de mitose, causando diminuição na proliferação de células normais e infectadas pelo HPV 16, sendo diretamente relacionada com a paragem em G0-G1 (VIEIRA; GOLDSTEIN; VILLA, 1996).

Achados divulgados por Tijong e colaboradores (2000), avaliando citocinas no lavado cervico-vaginal de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical e CC sem tratamento com interferon, relataram que os níveis de TNF- $\alpha$  e outras citocinas estavam significativamente elevados naquelas pacientes com câncer

cervical em relação às lesões precursoras, demonstrando dessa maneira alteração no ambiente imune cervical local em pacientes com câncer cervical.

Sabendo que existe uma associação entre a inflamação crônica, infecção persistente e o câncer (FERNANDES et al., 2015), e que esta inflamação pode aumentar até duas vezes risco das neoplasias intraepiteliais (NEY; COBUCCI; SOUZA, 2014) a diminuição local do TNF- $\alpha$  estaria talvez beneficiando de alguma forma a resposta ao HPV no grupo de pacientes com Boa resposta ao tratamento.

O TGF- $\beta$  está envolvido em muitos processos celulares, e eventos envolvendo sua sinalização vêm sendo demonstrados ao longo dos anos serem essenciais na progressão do câncer, devido seu papel proeminente na regulação do crescimento celular, diferenciação e migração de células para o microambiente tumoral (BIERIE; MOSES, 2006; MICHAEL PICKUP, SERGEY NOVITSKIY, 2013).

Na análise dessa citocina em nosso estudo, foi observado uma diminuição estatisticamente significativa durante o tratamento com todas as pacientes, sendo verificado ainda a mesma significância durante dois períodos da terapia (Gráfico 16). Os grupos que tiveram Boa e Má resposta ao tratamento com interferon  $\alpha$  peguilado mantiveram esse mesmo padrão de resposta de diminuição no decorrer da terapia com algumas variações e significância entre 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> aplicações no grupo que responderam ao tratamento (Gráfico 17A).

Ramos e colaboradores (2009) avaliando isoformas do TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3) no infiltrado do estroma de pacientes com neoplasia de alto grau tratadas com interferon intralesional não conseguiu correlacionar a expressão do mRNA com a resposta clínica após o tratamento, visto que apenas uma paciente com resposta satisfatória apresentou expressão concomitante do TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 após o tratamento, enquanto outras duas pacientes que não responderam ao tratamento expressaram TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3, sugerindo que a resposta imune Th3 pode ter modulado a resposta imune TH1 e TH2 durante a terapia e por isso houve falha terapêutica.

Trabalhos relatam que a via dessa citocina pode funcionar como um supressor do tumor em estágios pré-malignos da tumorigênese passando para promotor de tumores em estágios posteriores da doença, como também participar ativamente das metástases (IYER et al., 2005; PADUA; MASSAGUÉ, 2009; YANG, 2010). Porém, papel da via do TGF- $\beta$  como supressora ou ao nível das células do câncer é ainda motivo de debate, devido aos seus efeitos diferenciais nas fases precoces e tardias da carcinogênese (NEUZILLET et al., 2015).

Um outro estudo realizado por Misson e colaboradores (2010) avaliou níveis sérico de citocinas em pacientes tratadas com interferon intralesional e observou o mesmo perfil de resposta verificado neste trabalho; as concentrações TGF- $\beta$  apresentaram queda significativa nas pacientes que obtiveram sucesso terapêutico, inferindo assim que o aumento da citocina do perfil TH1 estimulou a queda das citocinas do perfil TH3. Neste mesmo grupo de estudo, Machado (2011), observando cortes histológicos do estroma de pacientes observou que níveis maiores do TGF- $\beta$  estavam associados à região do colo do útero que é mais sensível para o desenvolvimento da lesão, a zona de transformação.

Estudos prévios relacionaram essa diminuição do TGF- $\beta$  ao bloqueio da expressão da proteína E7 do HPV com conseqüente indução das células infectadas à apoptose e inibição da proliferação de células tumorais através da via TGF $\beta$ 1/SMADs (QIAN XU et al., 2006), além disso, níveis elevados de TGF- $\beta$  podem causar supressão na proliferação de células T específicas e NK ocasionando uma grande perda imunológica, já que células NK são 70% dos leucócitos nas mucosas e no endométrio (HICKEY et al., 2011; MSELLE et al., 2007). Além disso, essa citocina pode bloquear e inibir a maturação de células dendríticas e células TDC4<sup>+</sup> naives bem como respostas linfócitos T citotóxicos. (GILBERT et al., 1997; TIEMESSEN et al., 2003; WAHL et al., 2004)

Iancu e colaboradores (2010), demonstraram que a via de sinalização do TGF- $\beta$  pode contribuir para a progressão maligna da displasia cervical, enfatizando assim a importância da atividade biológica do TGF- $\beta$  na carcinogênese e a sua influência sobre genes do HPV. Diante dos fatos, tornam-se necessários estudos

adicionais tendo como alvo a via de TGF- $\beta$  no câncer e nas neoplasias causadas pelo HPV.

Uma mudança no perfil de secreção de citocinas, TH1 para TH2, com a perda da imunidade celular e conseqüentemente imunológica, pode levar ao câncer cervical e lesões de alto grau em mulheres infectadas pelo HPV, bem como promover uma infecção persistente possibilitando uma maior probabilidade de carcinogênese por HPV de alto risco (BAIS et al., 2005, 2007; LEE et al., 2004).

Sabe-se que uma das principais citocinas produzidas na diferenciação dos linfócitos TH helper para o perfil TH2 é a IL-4, e esse perfil pode inibir a ativação de macrófagos, linfócitos T citotóxicos e suprimir a imunidade mediada pelas células Th1 (PARDO-GOVEA et al., 2005). Dessa forma, ao observar os níveis dessa citocina em nosso trabalho, verificamos uma diminuição ao longo do tratamento com significância estatística no grupo de pacientes com Má resposta, sendo ainda verificado que entre a 1ª e 5ª; e 1ª e 6ª aplicações houve a mesma concordância.

No tratamento com o interferon intralesional, Mardegan (2008), avaliando as pacientes com lesões de alto também observou níveis baixos dessa interleucina em todas as pacientes durante o tratamento, não sendo observadas diferenças significativas entre os grupos, já neste mesmo grupo de estudo, Ramos (2009) avaliando a expressão mRNA da IL-4 naquelas pacientes com falha terapêutica, sugere que o padrão de resposta imune TH2 já estaria presente podendo ter contribuído para a persistência da lesão de alto grau e para a evasão do HPV à vigilância imunológica. Além disso, a expressão concomitante da IL-4 e TGF- $\beta$ 3 nessas após o tratamento com sugeria que a resposta imune TH3 poderia ter modulado a resposta imune TH2, impedindo assim uma resposta clínica satisfatória.

Este mesmo fato foi observado em nosso estudo quando avaliamos os dois grupos de pacientes, Boa e Má respostas para esta citocina durante os períodos do tratamento (Gráfico 22). Verificamos também que aquelas pacientes com falha na terapia apresentaram níveis significativamente elevados de IL-4 quando comparadas com aquelas que responderam no início do tratamento, sendo possível inferir que este poderia ser um padrão de resposta predominante, já que

vários estudos têm demonstrando que durante a carcinogênese do epitélio cervical ocorre uma mudança de resposta TH1 para TH2 (AZAR et al., 2004; DELGADO et al., 2009) e essa *downregulation* da imunidade celular pode explicar a perda imunológica do controle do HPV e suas complicações oncológicas (AGAROSSO et al., 2003; VAN DER BURG et al., 2004; ZHU et al., 2009)

Outros estudos relatam que esse perfil TH2 está associado com a persistência viral e progressão das lesões cervicais por modificações no sistema imune induzida por infecção pelo HPV (AZAR et al., 2004; SONG et al., 2015), e a IL-4, principal estímulo para o desenvolvimento de células TH2, pode antagonizar os efeitos ativadores de IFN sobre os macrófagos e, desse modo, inibir reações imunes mediadas por células (ABBAS & LITCHMAN, 2012).

Misson e colaboradores (2010), ao analisar a IL-4 no soro de pacientes tratadas com interferon intralesional, verificou que as citocinas do perfil TH2 não tiveram mudanças durante o tratamento e também que a maioria delas diminuiu de concentração após a terapia; já as citocinas TH1 aumentaram após o tratamento, principalmente nas pacientes que tiveram resposta terapêutica. Dessa maneira observamos que a terapia com IFN- $\alpha$  peguillado diminui os níveis da IL-4 naquelas pacientes com Má resposta e está aumentada no início do tratamento, sugerindo um perfil TH2 nessas pacientes. Estes achados estão em concordância com a literatura, onde níveis aumentados de citocinas TH2 e diminuição dos níveis de citocinas TH1 podem causar lesões neoplásicas do colo do útero, levando a uma conclusão de que esta dicotomia pode induzir a persistência da infecção pelo HPV e promover a progressão das lesões cervicais (BAIS et al., 2005; MOTA et al., 1999).

A interleucina 6 tem um amplo efeito tanto nas células do sistema imune como nas diversas células que compõe nosso organismo apresentando frequentemente características hormonais que afetam os processos homeostáticos e pró-anti-inflamatórias dependentes do contexto (HUNTER; JONES, 2015), e tem sido implicada no câncer cervical, embora seu papel permaneça indescritível (LIN-HUNG et al., 2001; WEI et al., 2003).

Nesse estudo, não observamos diferenças significativas para esta citocina, apenas um aumento com diminuição ao término do tratamento em todos os grupos estudados, fato este que está de acordo com os achados de Mardegan (2008) observando aquelas pacientes tratadas com interferon intralesional que tiveram falha após o tratamento. Seus achados porém estão em desacordo com o nosso estudo quando analisamos as medianas do grupo de pacientes com Boa resposta ao tratamento. Já neste mesmo grupo de estudo, Misson (2010) em análise do sangue periférico percebeu que sua concentração no final do tratamento era menor que no início, fato este também encontrado por nós neste estudo.

Em um trabalho realizado por Wei e colaboradores (2001), foram analisados cortes histológicos de pacientes com CC correlacionando com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) com a IL6 e a distribuição de seus receptores e encontrou evidências de uma maior consistência de IL-6 e VEGF nos tecidos cancerosos do que nos tecidos não cancerosos adjacentes em doentes com câncer do colo do útero em fase inicial.

Nosso estudo demonstra que a imunoterapia com interferon apresentou grande variação do conjunto de citocinas ao longo do tratamento das pacientes com neoplasia intraepitelial cervical, e a apesar de ter sido limitado pelo pequeno número de pacientes apresentou boa resposta quando comparado com o tratamento intralesional que variou de 40 a 65%. Também podemos dizer que a regressão está relacionada com o perfil imune antes do tratamento como no caso da IL-4 promovendo um perfil TH2 naquelas pacientes com falha terapêutica, reforçando a necessidade de análise aprofundada da desregulação imunológica nesses pacientes para resolução da infecção pelo HPV. Talvez pela óptica clínica, uma regressão de alto grau NIC III para NIC II não apresente grande efeito, mas imunologicamente podemos perceber progressos causados pelo tratamento com o interferon peguilado.

Dessa maneira, talvez em um futuro próximo possam ser elucidadas questões referentes às neoplasias causadas pelo HPV, bem como a terapia com interferon, utilizando e aprimorando estudos para caso não aconteça uma regressão, este tratamento possa pelo menos diminuir as lesões do colo do útero, fazendo com

que as intervenções médicas convencionais sejam menos agressivas, preservando assim o aparelho reprodutivo, principalmente naquelas pacientes jovens. Isso sugere que um melhor entendimento do papel das citocinas nas neoplasias cervicais, com consequente desenvolvimento para o CC é importante no contexto das terapias imunes, onde estudos dos padrões de citocinas na secreção cervical se justificam e são essenciais para o aprimoramento terapêutico.

## ***9 Conclusão***

## 9.0 - CONCLUSÃO

- O tratamento com IFN  $\alpha$ -2b peguilado em pacientes com NIC de alto grau, obteve resposta clínica satisfatória em 43,75% das pacientes.

- A diminuição da expressão de TGF- $\beta$  e do TNF- $\alpha$ , após o tratamento com IFN  $\alpha$ -2b, nas pacientes com boa resposta terapêutica, sugere uma diminuição de um perfil imunomodulador desta citocina.

- A resposta imune Th1 parece estar diminuída naquelas pacientes com falha terapêutica no início do tratamento, podendo este fato estar relacionado com aumento de IL-4 nessas pacientes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7ª A edição ed. Rio de Janeiro - RJ: **Elsevier Inc.**, 2012.
- ADEFUYE, P. O. et al. Trials and projects on cervical cancer and human papillomavirus prevention in sub-saharan Africa. **Vaccine**, v. 31, n. S5, p. 1–2, 2013.
- AGUIAR, L. S. et al. Avaliação crítica das nomenclaturas diagnósticas dos exames citopatológicos cervicais utilizadas no Sistema Único de Saúde (SUS); Critical evaluation of the diagnostic nomenclatures of cervical cytopathological exams used in the Brazilian Unified Heal. **Rev.bras.ginecol.obstet**, v. 33, n. 3, p. 144–149, 2011.
- AIDÉ, S. et al. Neoplasia intraepitelial cervical: Cervical intraepithelial neoplasia. **DST - Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis**, v. 21, n. 4, p. 166–170, 2009.
- ALFREDO AMADOR-MOLINA, JOSÉ FERNANDO HERNÁNDEZ-VALENCIA, EDMUNDO LAMOYI, A. C.-P. AND M.L. Role of Innate Immunity against Human Papillomavirus (HPV) Infections and Effect of Adjuvants in Promoting Specific Immune Response. **Viruses**, v. 5, p. 2624–2642, 2013.
- ANIC, G. M. et al. Incidence and human papillomavirus (HPV) type distribution of genital warts in a multinational cohort of men: the HPV in men study. **The Journal of infectious diseases**, v. 204, n. 12, p. 1886–92, 15 dez. 2011.
- APGAR, B. S.; ZOSCHNICK, L.; WRIGHT, T. C. The 2001 Bethesda System Terminology. **American Family Physician**, v. 68, n. 10, p. 1992–1998, 2003.
- AYRES, A. R. G.; SILVA, G. A. E. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. **Revista de saúde pública**, v. 44, n. 5, p. 963–74, 2010.
- AZAR, K. K., M. TANI, H. YASUDA, A SAKAI, M. INOUE E T. SASAGAWA. Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. **Hum Pathol**, v.35, n.11, Nov, p.1376-84. 2004.
- BAIS, A. G. et al. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. **Journal of clinical pathology**, v. 58, n. 10, p. 1096–100, 2005.
- BAJCETIĆ M, ZIGON N, SAMARDZIĆ R, B. D. Alpha interferons-new therapeutic modalities. **Med Pregl.**, v. 131, n. 3–4, p. 135–139, 1998.
- BALDRIDGE, M. T.; KING, K. Y.; GOODELL, M. A. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. **Trends Immunol**, v. 32, n. 2, p. 57–65, 2012.

B EGLIN, M.; MELAR-NEW, M.; LAIMINS, L. Human papillomaviruses and the interferon response. **Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 29, n. 9, p. 629–635, 2009.

BELTRÁN-LISSABET, J. F. Aspectos generales sobre la estructura y función de las proteínas codificadas por el virus del Papiloma Humano. **Revista CENIC Ciências Biológicas**, v. 45, n. 2, p. 108–118, 2014.

BERKHOF, J. et al. Cost-Effectiveness of Cervical Cancer Prevention in Central and Eastern Europe and Central Asia. **Vaccine**, v. 31, n. S7, p. H71–H79, 2013.

BERNARD, H. U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, n. SUPPL., p. 1–6, 2005.

BERNARD, H. U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70–79, 2010.

BEX A , MALLO H, KERST M, HAANEN J, HORENBLAS S, DE G. G. A phase-II study of pegylated interferon alfa 2b for patients with metastatic renal cell carcinoma and removal of the primary tumor. **Cancer immunology, immunotherapy**, v. 54, n. 7, p. 713–719, 2005.

BIERIE, B.; MOSES, H. L. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 7, p. 506–20, 2006.

BONNER, J. A. et al. Articles Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. **Lancet Oncology**, v. 11, p. 21–28, 2010.

BOSCH, F. X. et al. Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: a Worldwide Perspective. **Journal of National Cancer Institute**, v. 87, n. 11, p. 796–802, 1995.

BOSCH, F. X.; QIAO, Y.; CASTELLSAGUÉ, X. The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 94, n. 2, p. 8–21, 2006.

BRISSEON, J. et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low- and high-grade lesions. **American journal of epidemiology**, v. 140, n. 8, p. 700–710, 1994.

BURGER, P. M. et al. Increased IL-6 and IL-8 Levels in Cervicovaginal Secretions. **Gynecologic Oncology** 73, v. 73, p. 285–291, 1999.

BURNET, S. M. CANCER-A BIOLOGICAL APPROACH III. Viruses associated with neoplastic conditions. **British Medical Journal**, v. 1, p. 841–847, 1957.

CAESTECKER, M. DE. The transforming growth factor- $\beta$  superfamily of receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 15, p. 1–11, 2004.

CAMARA, G. N. N. DE L. et al. Os papilomavírus humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 1, n. 1, p. 149–158, 2008.

CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral Cancer and the tumor microenvironment. **Revista Médica**, v. 89, n. 1, p. 21–31, 2010.

CÂNCER, I. C. OF H. AND. Human Papillomavirus and Related Diseases Report - Brazil. **ICO Institut Catalã dOncologia**, v. 27, p. 6–20, 2016.

CASTELLSAGUE, X.; MUNOZ, N. Chapter 3 : Cofactors in Human Papillomavirus Carcinogenesis — Role of Parity , Oral Contraceptives , and Tobacco Smoking. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, n. 31, 2003.

CASTELLSAGUÉ, X. et al. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: Implications for screening and prevention. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 5, p. 303–315, 2006.

CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral Cancer and the tumor microenvironment. **Revista Médica**, v. 89, n. 1, p. 21–31, 2010.

CHEN, F. et al. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. **BMC Medicine**, v. 13, p. 45, jan. 2015.

CHOW, L. T.; BROKER, T. R.; STEINBERG, B. M. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. **Journal Compilation APMIS**, v. 118, n. 6–7, p. 422–49, jun. 2010.

CLERICI, M., M. MEROLA, E. FERRARIO, D. TRABATTONI, M. L. VILLA, B. STEFANON, D. J. VENZON, G. M. SHEARER, G. DE PALO E E. CLERICI. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. **J Natl Cancer Inst**, v.89, n.3, Feb 5, p.245-50. 1997.

CLERICI M, MEROLA M, FERRARIO E, TRABATTONI D, VILLA ML, STEFANON B, et al. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. **J Natl Cancer Inst** 1997;89:245-50.

CRUVINEL, W. D. M. et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**, v. 55, n. 11, 2010.

CRUZ, F. J.; MELO, V. H. HPV na cérvix uterina. **Revista Femina**, v. 1, n. 31, p. 423–27, 2010.

DALING, J. R. et al. The relationship of human papillomavirus-related cervical tumors to cigarette smoking, oral contraceptive use, and prior herpes simplex virus type 2 infection. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 5, n. 7, p. 541–548, 1996.

DAS, B. C. et al. Cancer of the uterine cervix and human papillomavirus infection. **Current Science**, v. 78, n. 1, p. 52–63, 2000.

DE LIMA, M. A. P.; DA SILVA, C. G. L.; RABENHORST, S. H. B. Papel das Proteínas Precoces do Papilomavírus Humano na Carcinogênese Role of the Human Papillomavirus Early Proteins in the Carcinogenesis. v. 59, n. 4, p. 565–573, 2013.

DE OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255–265, 2011.

DE VUYST, H. et al. The burden of human papillomavirus infections and related diseases in sub-saharan Africa. **Vaccine**, v. 31, n. S5, 2013.

DELGADO, F. G., E. MARTINEZ, M. A. CESPEDES, M. M. BRAVO, M. C. NAVAS E A. L. COMBITA ROJAS. Increase of human papillomavirus-16 E7-specific T helper type 1 response in peripheral blood of cervical cancer patients after radiotherapy. **Immunology**, Sep 5. 2008.

DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. **European Journal of Immunology**, v 37, suppl 1, p 34-45, 2007.

DENNIS, K. L. et al. Current status of IL-10 and regulatory T-cells in cancer Kristen. **Curr Opin Oncol**, v. 25, n. 6, p. 637–645, 2015.

DIPIRO, J. T. Cytokine networks with infection: mycobacterial infections, leishmaniasis, human immunodeficiency virus infection, and sepsis. **Pharmacotherapy**, v. 17, n. 2, p. 205–223, 1997.

DONNELLY, R. P.; KOTENKO, S. V. Interferon-Lambda : A New Addition to an Old Family. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 30, n. 8, p. 555–564, 2010.

DONNELLY, R. P. et al. The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. **Journal of leukocyte biology**, v. 76, n. 2, p. 314–321, 2004.

DUSSURGET, O.; BIERNE, H.; COSSART, AND P. The bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* and the interferon family : type I , type II and type III interferons. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. April, p. 1–12, 2014.

FEDRIZZI, E. N. Epidemiologia da infecção genital pelo HPV. **Rev Bras Pat Trato Gen**, v. 1, n. 1, p. 3–8, 2011.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide : Sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 386, n. 136, p. 359–386, 2015.

FERNANDES, A. P., M. A. GONCALVES, G. DUARTE, F. Q. CUNHA, R. T. SIMOES E E. A. DONADI. HPV16, HPV18, and HIV infection may influence cervical cytokine intralesional levels. **Virology**, v.334, n.2, Apr 10, p.294-8. 2005.

FERRAZ, L. D. C. et al. Ciclo celular , HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical : seleção de marcadores biológicos. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 30, n. 2, p. 107–111, 2012.

FINTER NB, CHAPMAN S, DOWD P, JOHNSTON JM, MANNA V, SARANTIS N, SHERON N, SCOTT G, PHUA S, T. P. The use of interferon-alpha in virus infections. **Drugs**, v. 42, n. 5, p. 749–765, 1991.

FITZMAURICE, C. et al. The Global Burden of Cancer 2013. **JAMA oncology**, v. 1, n. 4, p. 505–27, 2015.

FORMAN, D. et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. **Vaccine**, v. 30 Suppl 5, p. F12-23, 2012.

FRANCO, E. L.; COUPLÉE, F.; FERENCZY, A. Integrating human papillomavirus vaccination in cervical cancer control programmes. **Public Health Genomics**, v. 12, n. 5–6, p. 352–361, 2009.

FRANCO, E. L.; DUARTE-FRANCO, E.; FERENCZY, A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. **Canadian Medical Association**, v. 164, n. 7, p. 1017–1025, 2001.

FRANCO, E. L.; ROHAN, T. E.; VILLA, L. L. Epidemiologic Evidence and Human Papillomavirus Infection as a Necessary Cause of Cervical Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 6, p. 506–511, 1999.

GAIOTTI, D. et al. Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  Promotes Human Papillomavirus ( HPV ) E6 / E7 RNA Expression and Cyclin-Dependent Kinase Activity in HPV-Immortalized Keratinocytes by a ras-Dependent Pathway y. **MOLECULAR CARCINOGENESIS**, v. 27, p. 97–109, 2000.

GEE K, GUZZO C, CHE MAT NF, MA W, K. A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. **Inflamm Allergy Drug Targets.**, v. 8, n. 1, p. 40–52, 2009.

GEORGE, S. et al. Phase I trial of PEG-interferon and recombinant IL-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 62, n. 2, p. 347–354, 2008.

GERMANO, A. et al. Intralesional therapy using recombinant interferon alpha 2 B in lesions of the uterine cervix caused by human papilloma virus. **Minerva Ginecol**, v. 41, n. 6, p. 277–281, 1989.

GIANNINI SL, AL-SALEH W, PIRON H, JACOBS N, DOYEN J, BONIVER J, et al. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. **Clin Exp Immunol** 1998;113:183-9.

GILBERT, K. M. et al. Transforming growth factor-beta 1 induces antigen-specific unresponsiveness in naive T cells. **Immunological investigations**, v. 26, n. 4, p. 459–72, 1997.

GUERMONPREZ, P.; SAVEANU, L.; KLEIJMEER, M. et al. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. **Nature**, v.425, p.397-02, 2003.

GHITTONI, R. et al. Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. **Ecancermedicalsecience**, p. 1–9, 2015.

GRESSER I, FONTAINE D, COPPEY J, FALCOFF R, F. E. Interferon and murine leukemia. II. Factors related to the inhibitory effect of interferon preparations on development of Friend leukemia in mice. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 124, n. 1, p. 91–94, 1967.

GUIMARÃES, M. V. M. B. et al. Resposta imune ao HPV e as neoplasias intra-epiteliais cervicais em mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV: perfil de citocinas. **Femina**, v. 39, p. 275–280, 2011.

GUERMONPREZ, P.; SAVEANU, L.; KLEIJMEER, M. et al. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. **Nature**, v.425, p.397-02, 2003.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HILDESHEIM, A et al. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. **British journal of cancer**, v. 84, n. 9, p. 1219–1226, 2001.

HOLSCHNEIDER, C.H.; BALDWEN, R.L.; TUMBER, K.; AOYAMA, C.; KARLAN, B.Y. The fragile histidine triad gene: a molecular link between cigarette smoking and cervical cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 16, p. 5756-5763, 2005.

HPV, I. C. O.; CENTRE, I. Human Papillomavirus and Related Diseases Report, BRAZIL. **ICO Institut Catalã dOncologia**, p. 6–20, 2016.

HUANG, J. et al. Preclinical validation : LV / IL-12 transduction of patient leukemia cells for immunotherapy of AML. **Molecular Therapy — Methods & Clinical Development**, v. 3, n. August, p. 1–11, 2016.

HUCHKO, M. J. et al. Accuracy of visual inspection with acetic acid to detect cervical cancer precursors among HIV-infected women in Kenya. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 136, n. 2, p. 392–398, 2015.

HUNTER, C. A.; JONES, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nature Immunology**, v. 16, p. 448–457, 2015.

IANCU, I. V. et al. TGF-beta signalling pathway factors in HPV-induced cervical lesions. **Roum Arch Microbiol Immunol**, v. 69, n. 3, p. 113–118, 2010.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. **Journal of leukocyte biology**, v. 71, n. 6, p. 907–920, 2002.

IKEDA, H.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The roles of IFN $\gamma$  in protection against tumor development and cancer immunoediting. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 2, p. 95–109, 2002.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

IVASHKIV, L. B.; DONLIN, L. T. Regulation of type I interferon responses. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 1, p. 36–49, 2015.

IYER, S. et al. Targeting TGF beta signaling for cancer therapy. **Cancer biology & therapy**, v. 4, n. 3, p. 261–266, 2005.

J, K. Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience. **Semin Oncol.**, v. 29, n. 3, p. 18–26, 2002.

JEMAL, A. et al. Cancer burden in Africa and opportunities for prevention. **Cancer**, v. 118, n. 18, p. 4372–4384, 2012.

JOHNSON, T. L. et al. HPV detection by polymerase chain reaction (PCR) in verrucous lesions of the upper aerodigestive tract. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 4, n. 4, p. 461–465, 1991.

JUANG, V.; LEE, H.; LIN, A. M. Cationic PEGylated liposomes incorporating an antimicrobial peptide tilapia hepcidin 2 – 3 : an adjuvant of epirubicin to overcome

multidrug resistance in cervical cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 6047–6064, 2016.

KATZE, M. G. et al. Viruses and Interferon : A Fight for Supremacy. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. September, p. 675–687, 2002.

KIM, J. J. et al. Model-based impact and cost-effectiveness of cervical cancer prevention in sub-saharan Africa. **Vaccine**, v. 31, n. S5, p. F60–F72, 2013.

KJAER, S. K. Risk factors for cervical neoplasia in Denmark. **APMIS**, Supplement, v. 80, n. 1, p. 1–41, 1998.

KJELLBERG, L. et al. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. **British journal of cancer**, v. 82, n. 7, p. 1332–1338, 2000.

KOROMILAS, A E.; LI, S.; MATLASHEWSKI, G. Control of interferon signaling in human papillomavirus infection. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 12, n. 2–3, p. 157–70, 2001.

KOSIEWICZ, M. M. et al. Mechanisms of tolerance induced by transforming growth factor-beta -treated antigen-presenting cells: CD8 regulatory T cells inhibit the effector phase of the immune response in primed mice through a mechanism involving Fas ligand. **International Immunology**, v. 16, n. 5, p. 697–706, 2004.

KULKARNI, S. S. et al. Prevalence and distribution of high risk human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 in carcinoma of cervix, saliva of patients with oral squamous cell carcinoma and in the general population in Karnataka, India. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, n. 3, p. 645–648, 2011.

LABANI, S.; ASTHANA, S. Cervical cancer screening trials in India and ethical issues. **Indian Journal of Community Health**, v. 26, n. 3, p. 211–213, 2014.

LASFAR, A. et al. Characterization of the Mouse IFN- L Ligand-Receptor System : IFN- L s Exhibit Antitumor Activity against B16 Melanoma. **Cancer Res**, v. 9, n. 8, p. 4468–4477, 2006.

LETO, M. D. G. P. et al. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, n. 2, p. 306–317, 2011.

LIMA, D. N. DE O. et al. **Citopatologia Ginecologica**. Brasilia - DF: sgtes@saude.gov.br, 2012.

LIMA, M. A. P. DE; SILVA, C. G. L. DA; RABENHORS, S. HELENA B. Papel das Proteínas Precoces do Papilomavírus Humano na Carcinogênese Role of the Human Papillomavirus Early Proteins in the Carcinogenesis. **Revista Brasileira de Cancerologia** , v. 59, n. 4, p. 565–573, 2013.

LM, I. The interferons. **Cancer**, v. 15, n. 70, p. 940–945, 1992.

LIN-HUNG WEI, M.D., MIN-LIANG KUO, PH.D., CHI-AN CHEN, M.D., WEN-FANG CHENG, M.D., PH.D., SHAO-PEI CHENG, M.D., FON-JOU HSIEH, M.D., CHANG-YAO HSIEH, M.D., M. Interleukin-6 in Cervical Cancer: The Relationship with Vascular Endothelial Growth Factor. **Gynecologic Oncology**, v. 82, n. 149–56, 2001.

LO YL, T. W. Co-encapsulation of chrysothripsin-1 and epirubicin in PEGylated liposomes circumvents multidrug resistance in HeLa cells. **Chem Biol Interact.**, v. 242, p. 13–23, 2015.

LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 68, n. 2, p. 362–72, jun. 2004.

LOPEZ, M. C. E M. A. STANLEY. Cytokine profile of draining lymph node lymphocytes in mice grafted with syngeneic keratinocytes expressing human papillomavirus type 16 E7 protein. **J Gen Virol**, v.81, n.Pt 5, May, p.1175-82. 2000.

LORENZI, A. T.; SYRJÄNEN, K. J.; LONGATTO-FILHO, A. Human papillomavirus (HPV) screening and cervical cancer burden. A Brazilian perspective. **Virology journal**, v. 12, p. 112, 2015.

LOUIE, K. S. et al. Epidemiology and prevention of human papillomavirus and cervical cancer in sub-Saharan Africa: A comprehensive review. **Tropical Medicine and International Health**, v. 14, n. 10, p. 1287–1302, 2009.

MACHADO, F. A. Avaliação do infiltrado de células do sistema imunológico no estroma do colo uterino de pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical grau II – III após tratamento com interferon alfa-2b intralesional. [s.l.] **UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**, 2011.

MARCOLINO, L. D. **Perfil de citocinas no soro e na secreção cervical de mulheres com lesão intraepitelial de baixo grau , lesão intraepitelial de alto grau e carcinoma epidermóide invasor** . [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Faculdade de Medicina de Botucatu, 2011.

MARDEGAN M.C., RAMOS M.C., ADAD S.J., MICHELIN M.A., SHIMBA D., MURTA E.F. Immunological evaluation of vaginal secretion in patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia treated with intralesional interferon alpha-2b. **Eur J Gynaecol Oncol**. v. 32(3), p. 297-302, 2011

MASSIMO TOMMASINO. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. **Cancer Biology**, v. 26, p. 13–21, 2014.

- MEIJER, C. J. L. M. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. **Nature Publishing Group**, v. 14, n. 6, p. 395–405, 2014.
- MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 11, p. 552–580, 2010.
- MINDIOLA R, CAULEJAS D, NÚÑEZ-TROCONIS J, ARAUJO M, DELGADO M, M. J. Increased number of IL-2, IL-2 receptor and IL-10 positive cells in premalignant lesions of the cervix. **Invest Clin.**, v. 49, n. 4, p. 533–545, 2008.
- MCBRIDE, A. A.; JANG, M. K. Current understanding of the role of the Brd4 protein in the papillomavirus lifecycle. **Viruses**, v. 5, n. 6, p. 1374–94, jun. 2013.
- MCKINNEY, C. C.; HUSSMANN, K. L.; MCBRIDE, A. A. The Role of the DNA Damage Response throughout the Papillomavirus Life Cycle. **Viruses**, v. 7, n. 5, p. 2450–2469, 2015.
- MENDES, C.; JOSÉ, D. O.; LEVI, E. The Biological Impact of Genomic Diversity in Cervical Cancer Development. **Acta Cytologica**, p. 1–5, 2016.
- MICHAEL PICKUP, SERGEY NOVITSKIY, AND H. L. M. The roles of TGFβ in the tumour microenvironment Michael. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 13, p. 788–799, 2013.
- MICHELIN, M. et al. Helper T Lymphocyte Response in the Peripheral Blood of Patients with Intraepithelial Neoplasia Submitted to Immunotherapy with Pegylated Interferon-α. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5497–5509, 2015.
- MISSON, D. R. et al. Cytokine serum levels in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade II-III treated with intralesional interferon-(alpha) 2b. **Tumori**, v. 97, n. 5, p. 578–584, 2011.
- MOSCICKI, A.-B. et al. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/42-51, 31 ago. 2006.
- MOTA, F. et al. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV) -related premalignant cervical epithelium. **Clin Exp Immunol**, v. 116, p. 33–40, 1999.
- MUNOZ, N. et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer — NEJM. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 518–527, 2003.
- MUNOZ, N. et al. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. **British Journal of Cancer**, v. 100, n. 7, p. 1184–1190, 2009.

- MURTA, E.F.C.; TAVARES MURTA, B. Successful pregnancy after vaginal cancer treated with interferon. **Tumori**, v. 90, n. 2, p. 247–248, 2004.
- MURTA, E. et al. Human Papillomavirus Infection in Adolescents: Relation to Contraceptive Method, Pregnancy, Smoking, and Cytologic Findings. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**, v. 23, n. 4, p. 217–221, 2001.
- NARISAWA-SAITO, M.; KIYONO, T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus- induced carcinogenesis : Roles of E6 and E7 proteins. **Cancer Sci**, v. 98, n. 10, p. 1505–1511, 2007.
- NO, J. H. et al. Human Papillomavirus Vaccine : Widening the Scope for Cancer Prevention. **Molecular Carcinogenesis**, v. 50, p. 244–253, 2011.
- NEUZILLET, C. et al. Targeting the TGF-beta pathway for cancer therapy. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 147, p. 22–31, 2015.
- NEY, R.; COBUCCI, O.; SOUZA, P. C. DE. REVISÃO O papel da inflamação na carcinogênese induzida pelo HPV. **FEMINA**, v. 42, n. 2, p. 62–64, 2014.
- NOGUERES, I. B. Associação entre a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e outras infecções genitais femininas. **HU Revista**, p. 19–28, 2010.
- OLIVEIRA, G. R. DE et al. Fatores de risco e prevalência da infecção pelo HPV em pacientes de Unidades Básicas de Saúde e de um Hospital Universitário do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 35, n. 5, p. 226–32, 2013.
- PALEFSKY, J. Screening for Anal and Cervical Dysplasia in HIV-Infected Patients. **The PRN Notebook**, v. 6, n. 3, p. 24–31, 2001.
- PASSOS, M. R. L. et al. Papilomavírose humana em genital , Parte I. **J bras Doenças Sex Transm**, v. 20, n. 2, p. 108–124, 2008
- PENNA, C. et al. Intralesional beta-interferon treatment of cervical intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus infection. **Tumori**, v. 80, n. 2, p. 146–150, 1994.
- PETERS, J.H.; GIESELER, R.; THIELE, B.; STEINBACH, F. Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. **Immunol. Today**. v.17, n. 6, p. 273- 278, Jun.1996.
- PILLAI R M, PHD, JANAKI M. BABU, MSC, VINODA T. JISSA, MS. et al. Region-wise distribution of high-risk human papillomavirus types in squamous cell carcinomas of the cervix in India. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 20, n. 6, p. 1046–1051, 2010.

PINTO, V. F. C.; BARBOSA, V. F. C.; PAIVA, S. G. Aspectos epidemiológicos e citológicos de infecções pelo papilomavírus humano (HPV) em adolescentes. **Revista Científica do ITPAC**, v. 5, p. 1–10, 2012.

POTOČNIK, M. et al. Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in genital warts from males in Slovenia. **Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica**, v. 16, n. 3, p. 91–98, 2007.

PRETET, J. L.; CHARLOT, J. F.; MOUGIN, C. Virological and carcinogenic aspects of HPV. **Bull Acad Natl Med**, v. 191, n. 3, p. 611–623, 2007.

PUDNEY, J.; QUAYLE, A. J.; ANDERSON, D. J. Immunological Microenvironments in the Human Vagina and Cervix: Mediators of Cellular Immunity Are Concentrated in the Cervical Transformation Zone 1. **Biology of Reproduction**, v. 1263, n. August, p. 1253–1263, 2005.

QIAN XU, SHIXUAN WANG, LING XI, SUFANG WU, GANG CHEN, YUN ZHAO, YING WU, D. M. Effects of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein on the Growth of Cervical Carcinoma Cells and Immuno-Escape Through the TGF-beta1 Signaling Pathway. **Gynaecol Oncol**, v. 101, n. 1, p. 132–139, 2006.

RAMA, C. H. et al. Prevalence of genital HPV infection among women screened for cervical cancer. **Revista de saúde pública**, v. 42, n. 1, p. 123–130, 2008.

RAMOS, M. C. et al. Expression of cytokines in cervical stroma in patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia after treatment with intralesional interferon-2b. **European Journal of Gynaecological Oncology**, v. 31, n. 5, p. 522–529, 2010.

RAPAPORT, D. **HPV Livro: 2. Biologia do HPV**. Disponível em: <<http://hpvinfo.com.br/hpv-livro-2-biologia-do-hpv/>>. Acesso em: 1 set. 2016.

RAUTAVA, J.; SYRJÄNEN, S. Human papillomavirus infections in the oral mucosa. **J Am Dent Assoc**, v. 142, n. 8, p. 905–914, 2011.

RICHART, R. M. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. **Obstetrics and gynecology**, v. 75, n. 1, p. 131–3, 1990.

RICHART R M. NATURAL HISTORY OF CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA. **Clin Obstet Gynecol**, v. 10, n. 4, p. 748–784, 1967.

ROKITA, W. Colposcopy of abnormal transformation zone. **Wiadomości lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)**, v. 59, n. 7–8, p. 486–489, 2006.

RONCO, L. V. et al. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes and Development**, v. 12, n. 13, p. 2061–2072, 1998.

ROSA, M. I. DA et al. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 5, p. 953–964, 2009.

ROTELI-MARTINS, C. M. et al. Cigarette smoking and high-risk HPV DNA as predisposing factors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in young Brazilian women. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 77, n. 6, p. 678–682, 1998.

SAAVEDRA, K.; BREBI, P.; ROA, J. C. Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix, **Clinical Epigenetics**, p. 1–7, 2012.

SANKARANARAYANAN, R. et al. Infrastructure requirements for human papillomavirus vaccination and cervical cancer screening in sub-saharan africa. **Vaccine**, v. 31, n. S5, p. F47–F52, 2013.

SCHIFFMAN, M. H.; CASTLE, P. Epidemiologic studies of a necessary causal risk factor: human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95-96, n. 6, p. E2, 2003.

SEOUD, M. et al. Extended Middle East and North Africa: Summary recommendations for the prevention of human papillomavirus infections and related cancers including cervical cancer. **Vaccine**, v. 31, n. S6, p. G78–G79, 2013.

SONG SH, LEE JK, LEE NW, SAW HS, KANG JS, LEE KW. Interferon-gamma (IFN-gamma): a possible prognostic marker for clearance of high-risk human papillomavirus (HPV). **Gynecol Oncol** 2008; 108:543-8.

SCOTT, M.; STITES, D. P.; MOSCICKI, A. B. Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v. 6, n. 5, p. 751-755, Sept. 1999.

SCOTT, M. E., Y. MA, S. FARHAT, S. SHIBOSKI E A. B. MOSCICKI. Covariates of cervical cytokine mRNA expression by real-time PCR in adolescents and young women: effects of Chlamydia trachomatis infection, hormonal contraception, and smoking. **J Clin Immunol**, v.26, n.3, May, p.222-32. 2006.

SCOTT, M.E.; MA, Y.; KUZMICH, L.; MOSCICKI, A.B. Diminished IFN-gamma and IL-10 and elevated Foxp3 mRNA expression in the cervix are associated with CIN 2 or 3. **Int. J. Cancer.**, v.124, n.6, p.1379-1383, Mar.2009.

SHARMA A , RAJAPPA M, SAXENA A, S. M. Cytokine profile in Indian women with cervical intraepithelial neoplasia and cancer cervix. **Int J Gynecol Cancer.**, v. 17, n. 4, p. 879–885, 2007.

SMITH, J. S. et al. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 21, p. 1604–1613, 2002.

SMITH, J. H. F. Bethesda 2001. **Cytopathology**, v. 13, n. 1, p. 4–10, 2002.

SMITH, J. S.; PH, D. Prevalência idade específico de infecção por papilomavírus humano em mulheres: uma revisão global Abstrato propósito Visite ScienceDirect para ver se você tem acesso. **Journal of Adolescent Health**, v. 43, n. 4, p. 51–62, 2008.

SOLOMON, D. et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **Jama**, v. 287, n. 16, p. 2114–9, 2002.

SONG, S. H., J. K. LEE, N. W. LEE, H. S. SAW, J. S. KANG E K. W. LEE. Interferon-gamma (IFN-gamma): a possible prognostic marker for clearance of high-risk human papillomavirus (HPV). **Gynecol Oncol**, v.108, n.3, Mar, p.543-8. 2008.

STAFIL A, W. G. An international terminology of colposcopy: report of the Nomenclature Committee of the International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy PubMed Commons. **Obstet Gynecol**, v. 77, n. 2, p. 313–314, 1991.

STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine**, v.24 Suppl 1, Mar 30, p.S16-22. 2006.

STANLEY MA, PETT MR, C. N. HPV: from infection to cancer. **Biochem Soc Trans.**, v. 35, n. 6, p. 1456–1460, 2007.

STELLATO, G. Intralesional recombinant alpha 2B interferon in the treatment of human papillomavirus-associated cervical intraepithelial neoplasia. **Sexually transmitted diseases**, v. 19, n. 3, p. 124–126, 1992.

SYRJÄNEN, S.; SYRJÄNEN, K. Invited speakers The History of Papillomavirus Research. **Cent Eur J Public Health**, v. 16, n. 20, p. 7–41, 2008.

SYRJÄNEN, S. et al. Immunosuppressive cytokine Interleukin-10 ( IL-10 ) is up-regulated in high-grade CIN but not associated with high-risk human papillomavirus ( HPV ) at baseline , outcomes of HR-HPV infections or incident CIN in the LAMS cohort. **Virchows Arch**, v. 10, n. 455, p. 505–515, 2009.

TIEMESSEN, M. M. et al. Transforming growth factor-beta inhibits human antigen-specific CD4+ T cell proliferation without modulating the cytokine response. **International immunology**, v. 15, n. 12, p. 1495–1504, 2003.

THOMAS, L. On immunosurveillance in human cancer. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 55, n. 3–4, p. 329–333, 1982.

TJIONG MY, VAN DER VANGE N, TER SCHEGGET JS, BURGER MP, TEN KATE FW, OUT TA. Cytokines in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplasia. **Cytokine** 2001;14:357-60.

TSUKUI T, HILDESHEIM A, SCHIFFMAN MH, LUCCI J, CONTOIS D, LAWLER P, ET AL. Interleukin 2 production in vitro by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. *Cancer Res* 1996; 56:3967-74.

UCHIMURA, N. S. et al. Influência do uso de anticoncepcionais hormonais orais sobre o número de células de Langerhans em mulheres com captura híbrida negativa para papilomavírus humano. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 12, p. 726–730, 2005.

VACCARELLA, S.; BRUNI, L.; SEOUD, M. Burden of human papillomavirus infections and related diseases in the extended middle east and North Africa Region. **Vaccine**, v. 31, n. S6, p. G32–G44, 2013.

VARELLA, P. P. V; FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, p. 1–8, 2014.

VERHEIJEN, R. H. M. et al. Original Paper Differences in Cytokine mRNA Profiles Between Premalignant and Malignant Lesions of the Uterine Cervix. **European J Cancer**, v. 35, n. 3, p. 490–497, 1999.

VILLA, L. L. et al. Differential Effect of Tumor Necrosis Factor on Proliferation of Primary Human Keratinocytes and Cell Lines Containing Human Papillomavirus Types 16 and 18. **MOLECULAR CARCINOGENESIS**, v. 6, p. 5–9, 1992.

VILLIERS, E. DE et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17–27, 2004.

WAHL, S. M. et al. TGF-beta: the perpetrator of immune suppression by regulatory T cells and suicidal T cells. **Journal of leukocyte biology**, v. 76, n. 1, p. 15–24, 2004.

WALBOOMERS, J. M. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*, v. 189, n. 1, p. 12–19, 1999.

WEI, L. et al. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. **Oncogene**, v. 22, n. 7, p. 1517–1527, 2003.

WEI, L. Z. et al. Localized interleukin-12 delivery for immunotherapy of solid tumours. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 17, n. 11, p. 1465–1474, 2013.

WESA, A.; KALINSKI, P.; TATSUMI, T.; *et al* Polarized type-1 dendritic cells (DC1) producing high levels of IL-12 family members rescue patient Th1-type anti-melanoma CD4+ T cell responses in vitro. **Jorn. Immunother.** n°30, p.75 - 82, 2007.

WOODWORTH, C.D.; SIMPSON, S. Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized, and carcinoma cell lines. **Am. J. Pathol.**, v. 142, n.5, p. 1544-1555, May 1993.

WRIGHT, T. C. et al. Cervical intraepithelial neoplasia in women infected with human immunodeficiency virus: prevalence, risk factors, and validity of Papanicolaou smears. New York Cervical Disease Study. **Obstetrics and gynecology**, v. 84, n. 4, p. 591–597, 1994.

WU, M.-T. et al. Lifetime exposure to environmental tobacco smoke and cervical intraepithelial neoplasms among nonsmoking Taiwanese women. **Archives of environmental health**, v. 58, n. 6, p. 353–359, 2003.

YANG, L. TGF beta and cancer metastasis: An inflammation link. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 29, n. 2, p. 263–271, 2010.

YIM, E.-K.; PARK, J.-S. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. **Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association**, v. 37, n. 6, p. 319–24, 2005.

ZENG, X. et al. Passive Smoking and Cervical Cancer Risk: A Meta-analysis Based on 3 , 230 Cases and 2 , 982 Controls. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 6, p. 2687–2693, 2012.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 9, p. 690–8, 2000.

ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells : fates , functions , and faults. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1557–1570, 2008.

**ANEXO 1**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO**

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

Uberaba, ..... /..... /.....

\_\_\_\_\_

Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

\_\_\_\_\_

Documento de identidade

\_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador responsável

\_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador orientador

**Telefone de contato dos pesquisadores:** \_\_\_\_\_

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

**ANEXO 2****TERMO DE ESCLARECIMENTO**

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

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

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

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

Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificada com um número.

## ANEXO 3

## Tabela Valores Elisa

## Valores das dosagens de citocinas de todas as pacientes do estudo

Valores da citocina IL-2 na dosagem do ELISA							
Paciente	1 <sup>a</sup> Aplicação	2 <sup>a</sup> Aplicação	3 <sup>a</sup> Aplicação	4 <sup>a</sup> Aplicação	5 <sup>a</sup> Aplicação	6 <sup>a</sup> Aplicação	Resposta
1	146,6	72,831	114,75	27,188	167,936	183,629	<b>Má</b>
2	141,885	44,661	112,423	11,777	146,733	157,182	Boa
3	125,822	68,489	72,777	203,528	192,987	340,555	Boa
4	129,132	119,597	136,903	77,518	76,02	120,672	<b>Má</b>
5	109,363	109,075	357,972	63,088	158,313	147,132	<b>Má</b>
6	95,76	132,419	84,462	255,477	140,454	164,155	Boa
7	361,283	43,048	82,011	5,773	32,075	68,1	<b>Má</b>
8	210,781	167,464	180,978	102,139	121,278	82,848	<b>Má</b>
9	122,256	174,548	120,859	166,391	139,333	49,2	Boa
10	22,7	279,522	32,362	113,422	32,362	131,463	Boa
11	87,457	61,714	81,487	112,042	90,013	93,454	<b>Má</b>
12	122,674	195,892	30,843	127,526	119,737	169,52	<b>Má</b>
13	93,202	152,375	317,3	102,922	311,14	181,231	<b>Má</b>
14	278,387	146,6	56,939	50,988	103,8	35,12	<b>Má</b>
15	135,232	90,064	135,368	537,795	96,707	51,416	Boa
16	24,228	135,006	82,587	45,619	8,964	202,417	Boa

**Valores da citocina IL-12 na dosagem do ELISA**

<b>Paciente</b>	<b>1<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>2<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>3<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>4<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>5<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>6<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>Resposta</b>
1	61,919	133,791	34,103	38,447	59,205	111,645	<b>Má</b>
2	356,326	2,827	344,508	2,827	745,612	247,806	Boa
3	394,768	26,406	262,697	326,284	145,58	42,263	Boa
4	127,492	214,306	434,432	218,874	114,371	59,594	<b>Má</b>
5	175,931	243,018	161,039	509,788	1030,306	385,61	<b>Má</b>
6	206,047	393,051	2,827	226,759	292,182	28,718	Boa
7	661,675	2,827	196,811	25,939	2,827	2,827	<b>Má</b>
8	163,59	2,827	2,827	555,863	197,429	496,714	<b>Má</b>
9	133,461	431,298	264,18	397,341	145,255	451,227	Boa
10	86,085	541,633	93,224	247,508	2,827	226,457	Boa
11	173,412	205,126	345,374	153,666	304,467	259,727	<b>Má</b>
12	986,107	512,63	2,827	215,83	274,83	332,947	<b>Má</b>
13	298,916	300,086	369,839	560,134	260,916	113,691	<b>Má</b>
14	162,634	352,582	149,471	237,615	1673,99	141,997	<b>Má</b>
15	230,989	128,49	275,125	141,017	410,197	2,827	Boa
16	277,779	237,916	303,299	93,224	156,237	5190,003	Boa

**Valores da citocina IL-10 na dosagem do ELISA**

<b>Paciente</b>	<b>1<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>2<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>3<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>4<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>5<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>6<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>Resposta</b>
1	6,142	231,233	332,902	111,098	32,98	18,051	<b><i>Má</i></b>
2	43,31	45,395	29,415	8,928	75,266	32,98	Boa
3	53,348	21,703	71,513	54,432	22,977	20,244	Boa
4	16,496	12,705	34,69	111,807	22,632	98,07	<b><i>Má</i></b>
5	38,147	18,873	41,855	30,405	61,908	125,162	<b><i>Má</i></b>
6	28,343	76,705	9,971	93,842	152,045	23,359	Boa
7	1095,007	68,021	118,007	160,635	12,985	3,122	<b><i>Má</i></b>
8	21,194	53,782	74,456	32,843	8,875	191,768	<b><i>Má</i></b>
9	31,7	4457,157	81,979	158,949	55,789	40,125	Boa
10	3,122	107,934	159,464	37,781	5,644	80,331	Boa
11	41,269	16,963	10,528	111,684	47,43	63,729	<b><i>Má</i></b>
12	115,705	213,048	174,601	45,874	121,478	69,919	<b><i>Má</i></b>
13	52,634	170,71	75,565	48,818	15,937	50,764	<b><i>Má</i></b>
14	14,71	24,003	12,845	123,427	19,684	262,146	<b><i>Má</i></b>
15	44,628	90,38	9,611	19,442	50,545	64,244	Boa
16	9,611	19,442	26,09	3,122	17,426	32,151	Boa

**Valores da citocina Interferon- $\gamma$  na dosagem do ELISA**

<b>Paciente</b>	<b>1<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>2<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>3<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>4<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>5<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>6<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>Resposta</b>
1	12,842	0,63	134,199	14,847	26,429	131,332	<b><i>Má</i></b>
2	77,197	40,916	0,6	5,041	36,517	0,6	Boa
3	4,276	10,453	1,794	18,503	0,6	101,854	Boa
4	23,366	57,526	310,617	38,358	35,308	19,807	<b><i>Má</i></b>
5	52,856	189,185	78,681	54,575	19,373	366,411	<b><i>Má</i></b>
6	144,044	66,197	0,6	91,287	106,208	128,152	Boa
7	168,075	48,669	179,85	229,81	83,361	59,902	<b><i>Má</i></b>
8	12,783	64,538	13,162	19,633	34,53	233,845	<b><i>Má</i></b>
9	25,129	82,534	103,163	86,783	27,988	72,999	Boa
10	322,093	480,066	38,789	40,916	0,6	169,179	Boa
11	203,009	84,302	78,596	538,503	150,481	32,428	<b><i>Má</i></b>
12	212,22	144,952	0,6	15,545	16,183	381,18	<b><i>Má</i></b>
13	1,853	448,41	531,874	229,81	201,653	0,6	<b><i>Má</i></b>
14	320,434	21,341	0,6	119,061	53,544	120,028	<b><i>Má</i></b>
15	38,99	37,754	40,801	19,489	67,255	314,668	Boa
16	53,429	223,176	141,917	794,988	462,364	32,399	Boa

**Valores da citocina TNF- $\alpha$  na dosagem do ELISA**

<b>Paciente</b>	<b>1<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>2<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>3<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>4<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>5<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>6<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>Resposta</b>
1	11,567	6,279	7,559	152,333	300,305	7,512	<b>Má</b>
2	34,958	8,962	107,238	12,113	39,753	11,805	Boa
3	13,148	7,59	15,355	12,37	7,906	14,908	Boa
4	58,028	13,079	108,685	17,769	4,555	6,736	<b>Má</b>
5	11,279	9,532	7,107	44,971	13,549	243,76	<b>Má</b>
6	27,642	45,103	14,926	154,834	364,892	16,836	Boa
7	616,232	62,507	50,943	21,1	11,788	12,957	<b>Má</b>
8	97,56	80,56	46,716	13,34	14,5	181,067	<b>Má</b>
9	29,901	229,44	51,779	105,01	20,097	19,272	Boa
10	20,55	21,062	182,188	110,031	37,978	13,288	Boa
11	198,236	87,349	254,125	7,953	212,539	115,743	<b>Má</b>
12	219,392	229,315	99,392	85,19	210,643	34,08	<b>Má</b>
13	94,479	109,266	130,465	50,763	108,633	30,166	<b>Má</b>
14	16,381	54,44	212,233	180,241	8,639	45,412	<b>Má</b>
15	430,643	14,146	36,874	5,22	24,456	14,695	Boa
16	30,41	18,046	151,114	12,871	18,379	12,199	Boa

**Valores da citocina TGF- $\beta$  na dosagem do ELISA**

<b>Paciente</b>	<b>1<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>2<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>3<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>4<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>5<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>6<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>Resposta</b>
1	1799,907	1211,033	898,166	646,18	1271,799	1695,401	<b>Má</b>
2	5892,955	72,001	1480,53	720,38	1105,123	3242,763	Boa
3	2237,389	72,001	72,001	72,001	3324,152	72,001	Boa
4	842,496	505,945	72,001	1877,629	390,943	240,375	<b>Má</b>
5	1211,797	72,001	504,038	366,335	72,001	2208,543	<b>Má</b>
6	4494,303	2908,128	72,001	1155,678	72,001	72,001	Boa
7	72,001	72,001	72,001	72,001	72,001	72,001	<b>Má</b>
8	72,001	1000,591	72,001	72,001	72,001	72,001	<b>Má</b>
9	1520,353	72,001	2645,953	72,001	1087,88	72,001	Boa
10	72,001	72,001	1571,375	72,001	3695,126	72,001	Boa
11	7174,975	72,001	72,001	595,504	1140,183	838,305	<b>Má</b>
12	2906,903	2538,111	180,884	636,307	3034,247	647,076	<b>Má</b>
13	1188,816	3660,488	3371,446	1767,331	3366,724	72,001	<b>Má</b>
14	72,001	72,001	72,001	72,001	2176,965	72,001	<b>Má</b>
15	753,31	363,23	462,584	93,104	1127,749	531,512	Boa
16	72,001	3468,465	2026,68	72,001	1915,845	1154,904	Boa

**Valores da citocina IL-4 na dosagem do ELISA**

<b>Paciente</b>	<b>1<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>2<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>3<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>4<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>5<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>6<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>Resposta</b>
1	160,223	104,95	58,004	117,73	116,517	116,257	<b>Má</b>
2	29,899	63,949	324,669	201,939	14,228	80,033	Boa
3	95,11	537,129	52,441	21,195	136,655	97,723	Boa
4	295,671	160,223	198,816	57,202	169,862	93,117	<b>Má</b>
5	62,08	94,024	172,918	288,148	31,617	207,617	<b>Má</b>
6	74,468	116,691	37,866	171,632	150,8	2,337	Boa
7	240,215	2,337	784,926	117,644	82,832	32,525	<b>Má</b>
8	58,205	2,337	2,337	23,887	2,337	81,155	<b>Má</b>
9	89,472	165,663	219,578	118,422	67,364	73,707	Boa
10	16,225	22,794	25,924	71,606	239,384	25,805	Boa
11	264,333	233,246	46,33	84,594	99,159	74,563	<b>Má</b>
12	225,323	196,624	87,822	89,38	19,947	2,337	<b>Má</b>
13	94,748	70,742	137,411	69,009	58,305	6,535	<b>Má</b>
14	155,566	137,159	47,691	27,927	21,813	62,08	<b>Má</b>
15	2,337	26,161	66,1	160,711	228,376	33,652	Boa
16	121,441	28,626	63,262	33,427	436,974	95,019	Boa

**Valores da citocina IL-6 na dosagem do ELISA**

<b>Paciente</b>	<b>1<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>2<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>3<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>4<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>5<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>6<sup>a</sup> Aplicação</b>	<b>Resposta</b>
1	2,33	0,332	9,544	33,57	13,706	12,057	<b>Má</b>
2	22,061	113,654	68,316	296,991	143,43	36,106	Boa
3	182,993	131,379	142,574	190,279	28,996	64,105	Boa
4	12,607	2,273	13,85	32,45	4,793	54,339	<b>Má</b>
5	9,312	11,79	41,237	176,422	237,464	35,277	<b>Má</b>
6	184,211	162,211	182	12,722	44,849	63,14	Boa
7	85,325	620,039	79,66	648,987	311,282	16,972	<b>Má</b>
8	223,308	644,507	662,458	44,291	114,159	337,361	<b>Má</b>
9	29,07	32,948	40,845	24,557	124,453	49,79	Boa
10	78,501	49,628	632,202	298,997	123,845	329,697	Boa
11	86,662	9,654	486,072	26,556	12,903	36,26	<b>Má</b>
12	49,644	26,09	604,108	259,971	666,908	166,473	<b>Má</b>
13	207,561	83,246	152,565	13,485	34,651	426,472	<b>Má</b>
14	14,808	18,853	30,274	643,677	225,366	300,63	<b>Má</b>
15	143,411	0,781	11,713	0,332	599,881	58,82	Boa
16	192,896	158,641	469,106	262,924	407,559	261,91	Boa

