

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

Kézia de Jesus Aguiar Ferreira

**Análise da Expressão Gênica das Isoformas do Fator de Crescimento  
Transformador Beta (TGF- $\beta$ ) em Neoplasia Intraepitelial Cervical Graus I, II, III e  
Câncer Invasivo**

**Uberaba**

**2021**

Kézia de Jesus Aguiar Ferreira

**Análise da Expressão Gênica das Isoformas do Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- $\beta$ ) em com Neoplasia Intraepitelial Cervical Graus I, II, III e Câncer Invasivo**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Concentração em “Imunologia Básica e Aplicada”, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre

Orientação: Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin

Co-orientadora: Prof. Eddie Fernando Cândido Murta

**Uberaba**

**2021**

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

F441a Ferreira, Kêzia de Jesus Aguiar  
Análise da expressão das isoformas do fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) em neoplasia intraepitelial cervical graus I, II, III e câncer invasivo / Kêzia de Jesus Aguiar Ferreira – 2021.  
40 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2021

Orientador: Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin

Coorientadora: Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta

1. Neoplasia intraepitelial cervical. 2. Expressão gênica. 3. Imunoterapia. 4. Fator de crescimento transformador beta. I. Michelin, Márcia Antoniazi. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 618.146-006

Kézia de Jesus Aguiar Ferreira

Análise da Expressão das Isoformas do Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- $\beta$ )  
em Neoplasia Intraepitelial Cervical Graus I, II, III e Câncer Invasivo

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Concentração em “Imunologia Básica e Aplicada”, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Prof. Dr. Alexandre de Paula Rogério  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Prof. Dr. Douglas Reis Abdalla  
Faculdade de Talentos Humanos (FACTHUS)

Dedico a Deus porque Ele é tudo na  
minha vida, à minha filha que é meu lar e aos  
meus pais pelo apoio constante.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar à Deus, pelo qual, sem ele, este trabalho não existiria. Agradeço também a minha orientadora Dra. Márcia Antoniazzi Michelin pela convivência, pelo aprendizado, paciência, carinho e dedicação.

Aos meus amigos: Saulo, Jéssica, Polyana, Taíssa e Ana Paula, que fizeram com que estes dois anos se tornassem mais confortáveis e voassem com vento do tempo. Agradeço ao Cláudio que contribuiu me auxiliando em várias situações. E, por fim, sou grata a todos que passaram pela minha vida durante essa trajetória, sejam eles anônimos ou não. Deus abençoe vocês e muito obrigada.

“Cada descoberta nova da ciência é uma porta nova pela qual encontro mais uma vez Deus, o autor dela”

Albert Einstein

## RESUMO

**Introdução:** A neoplasia intraepitelial cervical (NIC) pode se transformar em câncer invasivo, depois que o mecanismo imunológico falha e o tumor se desenvolve a partir desse sistema através de mecanismo de escape. Uma das formas mais importantes de contornar a resposta imune é a produção de mediadores como a citocina Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- $\beta$ ), que pode atuar em inúmeras células. Sua função envolve diferenciação celular e controle da apoptose, porém, o TGF- $\beta$  pode atuar inibindo as células efetoras da imunidade adaptativa. No entanto, as três isoformas do TGF- $\beta$  têm funções diferentes na resposta imune. Entender o envolvimento delas dentro do tumor é essencial para o desenvolvimento de novas imunoterapias e novos marcadores biológicos de progressão da lesão. **Objetivo:** Quantificar e associar a expressão das isoformas TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3 em diferentes graus de lesões de NIC e câncer cervical. **Materiais e métodos:** Usando a técnica qPCR para analisar as isoformas de TGF- $\beta$ , 56 pacientes separadas em grupo Controle (n = 09), NIC I (n = 08), NIC II (n = 11), NIC III (n = 13) e Câncer Cervical (n = 15) foram avaliadas. **Resultados:** A expressão nos grupos NIC I, NIC II, NIC III e Câncer Cervical foi menor, para a isoforma TGF- $\beta$ 1, quando comparados com o grupo Controle (p=0,0002). As isoformas TGF- $\beta$ 2 (p=0,3496) e TGF- $\beta$ 3 (p=0,2810) não apresentaram expressões significativas nos testes estatísticos, em todos os grupos. **Conclusão:** O TGF- $\beta$ 1 pode estar relacionado à progressão da doença e pode ser usado como um marcador biológico, futuramente, para monitorar condições de tratamento e alvos para imunoterapia futura.

**Palavras-chave:** Neoplasia Cervical. Expressão gênica. Imunoterapia. Câncer invasivo. Fator de Crescimento Transformador Beta



## ABSTRACT

**Introduction:** Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) can develop into invasive cancer after the immune mechanism fails and the tumor develops from this system through an escape mechanism. One of the most important ways to bypass the immune response is the production of mediators such as the cytokine Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ), which can act on numerous cells. Its function involves cell differentiation and apoptosis control, however, TGF- $\beta$  can act by inhibiting the effector cells of adaptive immunity. However, the three isoforms of TGF- $\beta$  have different roles in the immune response. Understanding their involvement within the tumor is essential for the development of new immunotherapies and new biological markers of lesion progression. **Objective:** Quantify and associate the expression of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, and TGF- $\beta$ 3 isoforms in different degrees of CIN lesions and cervical cancer **Materials and methods:** Using the qPCR technique to analyze the TGF- $\beta$  isoforms, 56 patients separated into the Control (n = 09), CIN I (n = 08), CIN II (n = 11), CIN III (n = 13) and Cervical Cancer (n = 15) groups were assessed. **Results:** The expression in the CIN I, CIN II, CIN III, and Cervical Cancer groups was lower for the TGF- $\beta$ 1 isoform, when compared to the Control group (p=0.0002). The isoforms TGF- $\beta$ 2 (p=0.3496) and TGF- $\beta$ 3 (p=0.2810) did not present significant expressions in the statistical tests, in all groups. **Conclusion:** TGF- $\beta$ 1 may be related to disease progression and can be used as a biological marker in the future to monitor treatment conditions and targets for future immunotherapy.

**Keywords:** Cervical neoplasia. TGF-  $\beta$ . Gene expression. Immunotherapy. TGF- $\beta$  isoforms. Invasive cancer

## LISTA DE SIGLAS

- APC- Células apresentadoras de antígenos
- CD3+- Cluster of differential 3
- CD36- Cluster of differential 36
- CD4+- Cluster of differential 4
- CD45+- Cluster of differential 45
- CD8+- Cluster of differential 8
- CTZ- Zona de transformação cervical
- EMT- Mesenchymal Epithelium Transition
- HPV- Papilomavirus humano
- HSIL- Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
- IFN- $\alpha$ - Interferon alpha
- IFN- $\gamma$ - Interferon gama
- Il- Interleucina
- KFL6- Krueppel-like factor 6
- LSIL- Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
- NIC- Neoplasia Intraepitelial Cervical
- OMS- Organização Mundial da Saúde
- PCR- Polymerase Chain Reaction
- RT- Reverse Transcription
- TGF- $\beta$ - Fator de Crescimento Transformador Beta
- Treg- Células T regulatórias

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
1.1	Etiologia das Lesões Pré-Neoplásicas .....	9
1.2	Mecanismo de Ação Viral .....	11
1.3	Classificações das Lesões.....	12
1.4	Resposta Imune no Colo Uterino .....	14
1.5	Fator de Crescimento Beta (TGF- $\beta$ ) .....	16
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	17
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	18
3.1	Objetivos Específicos .....	18
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	18
4.1	Sujeitos do Estudo .....	18
4.2	Extração de DNA, RNA e Proteínas .....	19
4.3	Rt-PCR e Eletroforese em gel de Poliacrilamida.....	19
4.4	Análise Estatística.....	20
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	21
5.1	Artigo .....	21
<b>6</b>	<b>COMENTÁRIOS FINAIS</b> .....	32
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	33
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34
	<b>ANEXO</b> .....	38

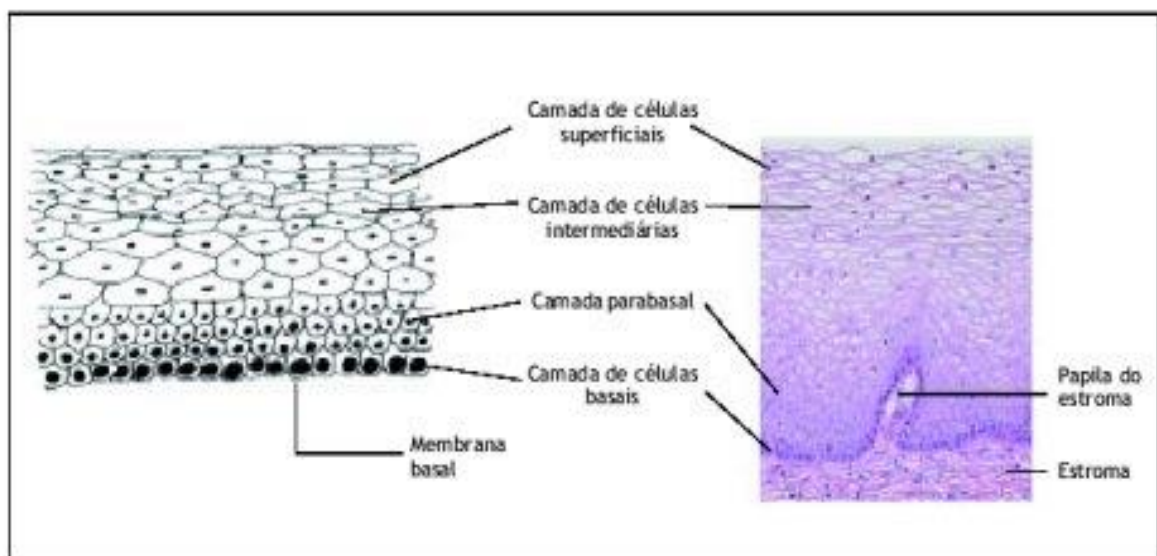
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Etiologia das Lesões Pré-Neoplásicas

O útero é um órgão do sistema reprodutor feminino, localizado na região pélvica, que durante a gravidez permite o desenvolvimento fetal. O útero é formado pelo miométrio (músculo) e o endométrio (mucosa esponjosa). Ele é dividido em fundo, corpo e o colo. O colo uterino é localizado na parte inferior do útero, direcionado para baixo e para trás, sendo dividido em duas partes: a endocérvice que constitui a parte interna do colo, onde o canal endocervical faz a conexão da vagina com o interior do útero, e a ectocérvice constitui a parte externa do colo (AGOSTINIS *et al.*, 2019).

A mucosa da endocérvice e o canal endocervical são compostos por tecido epitelial colunar em camada única. As glândulas presentes no canal endocervical são produtoras de muco, atuando na prevenção de infecção ascendente. A ectocérvice é composta por tecido epitelial estratificado escamoso e não queratinizado, formando uma barreira protetora mais efetiva que a do epitélio colunar (TRIFONOVA *et al.*, 2014)

O tecido epitelial estratificado escamoso é composto por células basais (núcleos grandes) que vão dar origem à camada de células parabasais (núcleos pequenos e redondos), à camada de células intermediárias e à camada de células superficiais (núcleos picnóticos). Todo esse processo de formação das camadas celulares ocorre pela divisão e maturação das células basais (Figura 1) (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2021).



**Figura 1:** Epitélio escamoso estratificado. **Fonte:** (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2021)

O tecido epitelial colunar passa por uma substituição para tecido epitelial escamoso metaplásico na região do colo uterino, conhecido como zona de transformação. As células da metaplasia escamosa imatura/madura junto com as ilhotas interpostas do epitélio colunar, sendo livre de sinais de carcinogênese cervical, compõem a zona de transformação do colo uterino normal. A presença de alteração displásica na zona de transformação serve como evidência do desenvolvimento de carcinogênese cervical (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2021).

A células escamosas presentes, principalmente na zona de transformação da ectocérvice, compõem o tecido do carcinoma de células escamosas. Já na endocérvice encontram-se as células epiteliais glandulares colunares que caracterizam os adenocarcinomas. Com grau de importância relativamente alto para a carcinogênese, o HPV pode ser constatado em, aproximadamente, 100% dos casos de câncer cervical (WALBOOMERS *et al.*, 1999).

Os meios de contágios como as relações sexuais desprotegidas e a troca de parceiros acentuada, somando-se aos fatores de risco como tabagismo e a falta de acesso à educação escolar, tem contribuído para o aumento da incidência de câncer cervical (NGOMA; AUTIER, 2019).

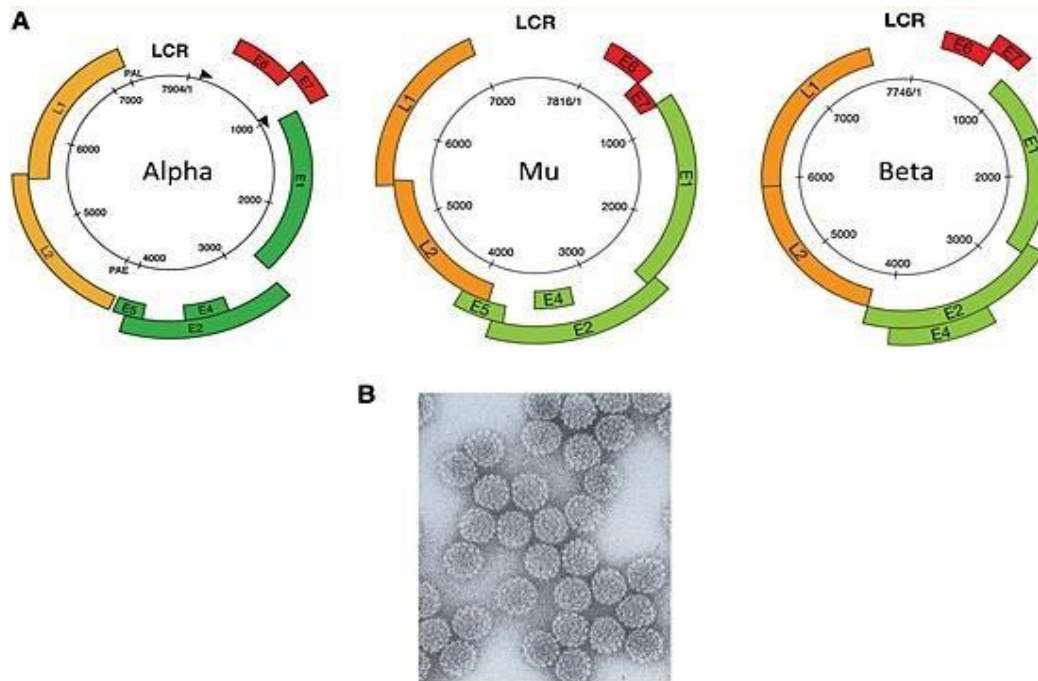
Apesar dos avanços tecnológicos para a prevenção e tratamento dos variados tipos de tumores, ainda ocorrem incidências anuais relevantes. Segundo a OMS, em todo o mundo, no ano de 2018 o câncer de colo de útero ocupou o quarto lugar no *ranking*, com a incidência de 567.847 casos, causando a morte de aproximadamente 311.365 mulheres. A incidência e mortalidade por câncer de colo de útero poderiam ser ínfimos, uma vez que essa doença é prevenível, detectável e tratável, principalmente na fase do desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas.

Existem mais de 200 tipos de HPVs, os quais são classificados de acordo com seu mecanismo de ação. Eles estão classificados em cinco gêneros:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$  e  $\nu$  (Figura 2). Estão classificados no gênero alpha ( $\alpha$ ), os tipos oncogênicos com significativa representação nos carcinomas cervicais, com porcentagem importante no desenvolvimento de carcinomas anogenitais e orais (MCLAUGHLIN-DRUBIN, 2015; BRIANTI *et al.*, 2017).

Os HPVs dos tipos 16 e 18 estão associados ao maior número de casos de carcinoma invasivo, displasias cervicais e anais. Ainda, os HPVs de alto risco incluem os HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82 (MUÑOZ *et al.*, 2003; BRIANTI *et al.*, 2017).

A persistência da infecção por HPV no colo de útero pode levar à progressão das lesões de alta gravidade como NIC III, que, quando não tratadas há grande probabilidade de se

tornarem lesões invasivas. O HPV16 tem sido o maior causador de lesões, apresentando positividade em 55% a 60% dos casos de câncer. O segundo tipo mais oncogênico é o HPV18, com representação em 10% a 15% das lesões e os outros tipos ficaram com 25% a 35% restantes (SASLOW *et al.*, 2012).



**Figura 2. Conformação genômica dos HPVs.** A. Organização típica do genoma dos HPVs de alto risco Alpha, Mu e Beta. B. Micrografia eletrônica de partículas de *Papilomavírus* coradas negativamente. **Fonte:** (DOORBAR *et al.*, 2015).

## 1.2 Mecanismo de Ação Viral

Todos os HPVs possuem sequências gênicas principais e bem resguardadas que estão relacionados com a replicação (E1 e E2) e empacotamento (L1 e L2). As demais funções como libertação viral, fuga do sistema imunológico e a orientação do acesso ao ciclo celular, são responsabilidades dos genes E4, E5, E6 e E7, respectivamente (DOORBAR *et al.*, 2012).

Assim como a L1 (proteína principal do capsídeo), o gene E1 é bem conservado. Ele é responsável por codificar uma helicase de DNA, muito precisa para a amplificação e replicação do genoma do vírus. As funcionalidades do gene E2 estão sujeitas a como ele interage com o material genético celular e das alterações de suas atribuições normais em benefício do vírus (DOORBAR *et al.*, 2015).

A fim de consentir à amplificação do material genético viral nas células epiteliais basais, e ainda inibir fatores da imunidade inata, os genes E6 e E7 executam uma função crucial no

acesso ao ciclo celular. Também, eles podem ser controlados por E2 na fase transcricional (DOORBAR, 2013)

O gene E5 assim como o E4 transparece uma heterogeneidade de sequência entre os tipos de HPV, que reflete as diferenças nos meios de transmissão e tropismo viral, que no gênero *Alpha* está paralelo ao E2 e assim, junto ao E6 e E7 estão relacionados ao escape da vigilância imunológica. Também estão envolvidos na potencialização da capacidade de amplificação do genoma (DIMAIO; PETTI, 2013).

À medida que a célula infectada migra para a camada superficial do epitélio, a expressão gênica viral do HPV 16 é muito bem controlada. A regulação negativa da apoptose e a proliferação das células epiteliais estão diretamente relacionados à exacerbação da expressão dos oncogenes E6 e E7 (DOORBAR, 2006).

O mecanismo de ação viral começa a partir da interação da membrana dos queratinócitos com a cápsula viral, onde é induzido a fagocitose nas células. Ao passar pela maquinaria endossomal, a acidez ali presente, desmancha a cápsula viral, e o material genético é liberado facilitando a sua chegada ao núcleo da célula hospedeira. Uma vez dentro, os genes virais E1 e E2 começam a replicação enquanto os genes E6 e E7 bloqueiam as proteínas p53 e pRb induzindo um estado proliferativo e não-diferenciado dos queratinócitos infectados (TUMMERS; BURG, 2015).

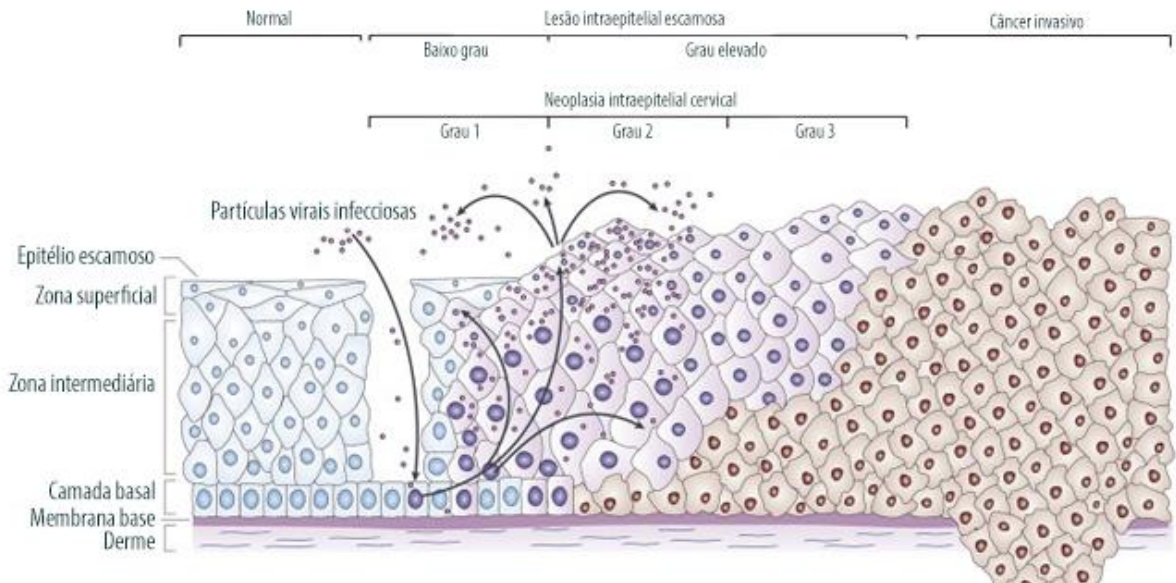
### 1.3 Classificações das Lesões

Ao inspecionar uma lâmina histológica é possível fazer a identificação de atipias e prematuridade celular presentes no epitélio. Sendo assim, a NIC é uma situação de pré-malignidade do câncer cervical. Portanto, NIC I é usado para representar displasia leve, NIC II e NIC III usados para denotar displasia moderada e grave, respectivamente (GUO *et al.*, 2016).

O enquadramento das lesões foi estabelecido pelo *Sistema Bethesda* (2014) de classificações citológicas. Então, ficou definido que as classificações das lesões de células escamosas seriam LSIL para lesões intraepiteliais de baixo grau (NIC I); HSIL para lesões de alto grau (NIC II e III) e por último, carcinoma de células escamosas (SOLOMON, 2015).

Os núcleos das células, presentes na displasia, apresentam-se alargados em diferentes formatos e tamanhos sendo uma característica de células atípicas no epitélio. Então, as células não-maduras atípicas podem ser visualizadas no terço inferior do epitélio em NIC I. Também, as mesmas células aparecem em uma porção de 2 terços inferior do epitélio em NIC II. Para NIC III, essas células estão presentes em todo o fragmento epitelial. E quando essas células

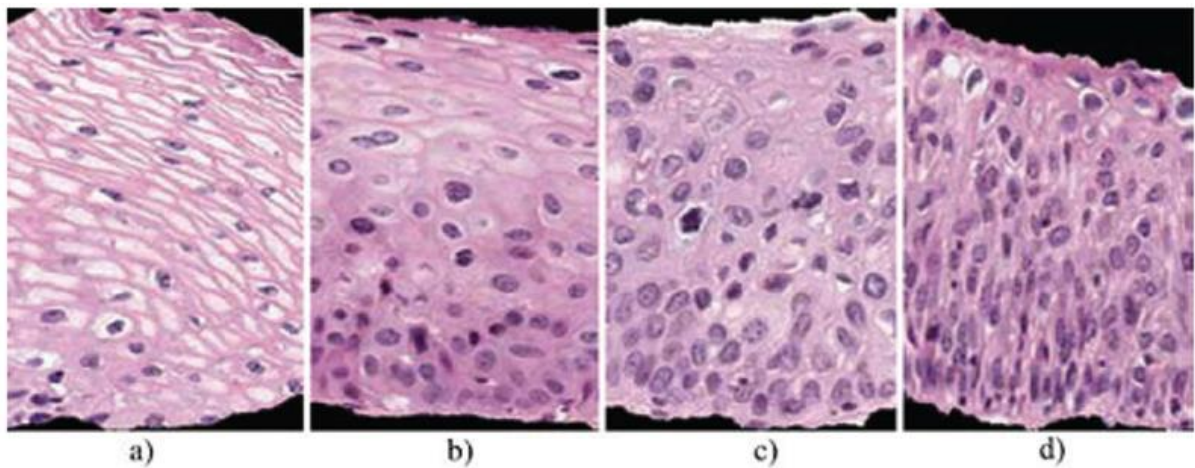
extravasam a membrana basal para além do tecido epitelial, é indicativo de carcinoma (ISMAIL *et al.*, 1990) (Figuras 3 e 4).



**Figura 3-** Graus de Lesões geradas pelo HPV (ADAPTADO)

**Fonte:** (WOODMAN *et al.*, 2007)

Alguns estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de melhorar a classificação das imagens epiteliais cervicais. Os núcleos são utilizados como recursos essenciais, principalmente, se equivalendo de tecnologias computacionais que são capazes de identificar características retiradas das imagens histológicas. Contudo, a detecção precisa, pode ser afetada devido a variabilidade de coloração que alguns tecidos e núcleos possam apresentar, além de outros fatores como núcleos sobrepostos, variações de tamanho e formato dos núcleos que são mais comuns em NIC alto grau (SORNAPUDI *et al.*, 2018).





**Figura 4-** Demonstração de alterações celulares do epitélio de acordo com a gravidade da lesão, de baixo para cima. (a) Normal, (b) NIC I, (c) NIC II, (d) NIC III. **Fonte:** (GUO *et al.*, 2016)

#### 1.4 Resposta Imune no Colo Uterino

As células em maior quantidade na ectocérvice são mononucleares de fenótipo CD45+, representadas pelos linfócitos T e B, apresentando uma correlação com a microbiota local. Portanto, grande parte dessas células possuem um fenótipo efetor de memória. Aproximadamente 35% dessas células fenótipo CD45+ são linfócitos T, com prevalência igual de células T CD4+ (T auxiliares) e T CD8+ (T citotóxicos) na ectocérvice (BARRIOS DE TOMASI *et al.*, 2019).

As APCs e os linfócitos apresentam uma preferência para a CTZ. Sendo assim, são essenciais para formação de defesa e delimitação entre a ectocérvice repleta de patógenos e a endocérvice considerada estéril (JACOBS *et al.*, 2003).

As células que se acumulam na CTZ são os linfócitos T CD8+ transformando essa região em um decisivo bloqueio imunológico aos patógenos ascendentes. Entretanto, as células T CD4+ possuem a maior concentração na CTZ, e que também é onde se origina mais de 90% dos cânceres cervicais (PUDNEY *et al.*, 2005).

Durante a infecção, principalmente no câncer invasivo, ocorre um aumento de leucócitos e neutrófilos por indução inflamatória e necrótica local. Contudo, em número absoluto, há uma redução de linfócitos e uma deficiência na produção de citocinas do perfil de resposta Th1, o que é favorável para a progressão da lesão (BAIS *et al.*, 2005).

O perfil de resposta Th1 é composto por células Th1, uma subpopulação de células T CD4+, que foram diferenciadas a partir de células Th0 estimuladas por citocinas como a IL12, IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Enquanto, a IL4 pode induzir a diferenciação de Th0 para Th2. Sendo assim, as citocinas IFN- $\gamma$  e células Th1 estavam diminuídas nas pacientes com câncer cervical, em contrapartida, as células Th2 e a citocinas IL4 estavam significativamente aumentadas quando comparadas às dos controles (LIN *et al.*, 2019).

Em estudo prévio realizado pelo grupo, foi observado que a proporção de citocinas pró-inflamatórias (como IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) nos grupos LSIL, HSIL e Invasivo foi menor em comparação com o grupo controle. Dado que essas citocinas participam da erradicação de patógenos intracelulares e são ativadores eficazes da imunidade mediada por células, isso reforça a ideia de que as citocinas Th1 são reduzidas na doença avançada (PEGHINI *et al.*, 2012).

Devido a detecção positiva de várias citocinas no colo uterino cervical infeccionado pelo HPV, foi possível traçar um perfil de resposta local. Então, pacientes com que tiveram as lesões progredidas, apresentavam expressões exacerbadas do TGF- $\beta$  que combinado com IL-4 deu característica ao perfil de resposta Th2. E, em combinação com outras citocinas que não a IL-4 foi caracterizado o perfil Treg (Regulador) (PEGHINI *et al.*, 2012).

O TGF- $\beta$  é uma citocina polipeptídica com múltiplas funções, responsável pela regulação de células em crescimento e diferenciação, controle da apoptose, motilidade, produção de matriz extracelular, respostas imunes celulares e angiogênese (MASSAGUÉ, 1998; ARTEAGA, 2003).

Portanto, na fase inicial do tumor o TGF- $\beta$  induz a supressão do processo de formação tumoral, mas em estágios avançados, células cancerígenas superexpressam esta citocina promovendo proliferação celular e a metástase dessas células tumorais (HAQUE; MORRIS, 2017).

A produção elevada de TGF- $\beta$  na infecção pelo HPV, favorece a transformação celular, pois alterações genômicas são promovidas. Estas caminham em conjunto com aumento da proliferação celular, ainda, quando produzido por células infectadas, estimula a migração de células de perfil imunossupressoras que regula negativamente as células antitumorais (BOCCARDO *et al.*, 2010).

Durante o início da formação tumoral experimental, a citocina TGF- $\beta$  controla o crescimento das células epiteliais, porém, o poder mutante presente no vírus do HPV torna as células epiteliais do colo uterino insensíveis ao fator regulador do TGF- $\beta$  principalmente nos estágios finais (EL-SHERIF *et al.*, 2000).

Novas formas de tratamentos para as lesões de alto risco, como imunoterapia com IFN- $\alpha$  pegulado, têm sido desenvolvidos como meios alternativos aos tratamentos invasivos dessas lesões. Contudo, algumas pacientes não apresentaram reduções das lesões e sim aumento de citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$  que são de perfil imunorregulatório junto com o aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (MICHELIN *et al.*, 2015).

Células imortalizadas pelo HPV (HeLa) foram utilizadas em testes para averiguar a importância do TGF- $\beta$  produzido por plaquetas do microambiente tumoral, na progressão do carcinoma. O receptor de TGF- $\beta$  foi bloqueado e a proliferação das células HeLa mediada por plaquetas foi impedido. Portanto, o bloqueador impediu a desativação do gene supressor de tumor KFL6 (HE *et al.*, 2017).

Um ensaio foi realizado com células HeLa para averiguar o efeito da citocina TGF- $\beta$  sobre CD36 (fator proliferativo). O gene CD36 foi silenciado em células HeLa, porém ao serem

tratadas com TGF- $\beta$ , o gene CD36 foi expresso indicando uma interação de ambos para promover o microambiente tumoral (DENG *et al.*, 2019).

### 1.5 Fator de Crescimento Beta (TGF- $\beta$ )

A superfamília dos fatores de crescimento a qual o TGF- $\beta$  se insere é dividida em subfamílias, apresentando cinco isoformas distintas da citocina (CHEIFETZ *et al.*, 1987). Elas apresentam cerca de 68-84% de homologia, porém, apenas três isoformas foram identificadas nas células de mamíferos, que são TGF-  $\beta$ 1, TGF-  $\beta$ 2 e TGF-  $\beta$ 3 com significativas semelhanças e correspondências (EL-SHERIF *et al.*, 2000; KATZ *et al.*, 2013)

A isoforma TGF- $\beta$ 1 que é comumente encontrada em cartilagens, ossos, pele e na ossificação endocondral onde é responsável pela parada do ciclo celular epitelial e controle da hematopoese (CHEIFETZ *et al.*, 1987; MASSAGUÉ, 1998). Mas quando induzida pelas oncoproteínas E6 e E7 do HPV 16 em conjunto com a expressão de IL-10 instiga um escape através da predominância de um estado imunossupressor no microambiente tumoral (TORRES-POVEDA *et al.*, 2014).

A isoforma TGF- $\beta$ 1 em conjunto com a proteína P16<sup>CDKN2A</sup> podem ser utilizados como biomarcadores representativos para a identificação da progressão do NIC para o câncer ou até mesmo sinalizar uma infecção precoce pelo HPV (VILORIA *et al.*, 2018).

A expressão da isoforma TGF- $\beta$ 2 é mais evidente nas células do sistema nervoso, principalmente em células astrogliais e neurônios, com a função crucial de proliferação celular e responsável ainda pelas células mesenquimais diferenciadas e proliferadas (CHEIFETZ *et al.*, 1987; MASSAGUÉ, 1998; HAQUE; MORRIS, 2017).

Um estudo utilizando queratinócitos infectados com HPV-16 E6/E7 semeados em meio de cultura e tratados com a isoforma TGF- $\beta$ 2 em concentrações parecidas com às secretadas, demonstraram que a isoforma TGF-  $\beta$ 2 impediu a imortalização de queratinócitos do colo uterino. Portanto, a regulação negativa do TGF-  $\beta$ 2 pelas oncoproteínas pode favorecer o processo de transformação celular em células neoplásicas (NEES *et al.*, 2000).

A isoforma TGF- $\beta$ 3 é evidenciada principalmente no tecido pulmonar e participa de alterações epiteliais e interações químicas que venham a acontecer nesses tecidos (HAQUE; MORRIS, 2017). Além disso, atua na produção de matriz extracelular e na imunossupressão (CHEIFETZ *et al.*, 1987; MASSAGUÉ, 1998)

Células triplo negativas do câncer de mama estão diretamente relacionadas a EMT na qual favorece a invasão e imigração de tumores. O TGF- $\beta$ , tem sido caracterizado como o

promotor da EMT, portanto, o câncer de mama triplo negativo apresentou alta expressão de TGF-  $\beta$ 1 e TGF-  $\beta$ 2 em relação as células não triplo negativas, o que pode estar associada com a invasão e migração de células triplo negativas (KIM *et al.*, 2015).

Um estudo realizado com pacientes portadores do meningioma de graus I ao III apresentaram redução na expressão de TGF-  $\beta$ 3 à medida que o grau aumentava além de estarem diminuídos em tumores recorrentes e aumentados em tumores primários. Por isso, o TGF-  $\beta$ 3 diminuído é indicativo de recorrência e mortalidade no meningioma (MA *et al.*, 2019)

Diferentemente, em pacientes com câncer de mama, o TGF-  $\beta$ 3 foi detectado, todavia, em situações onde metástases em linfonodos axilares foram identificados, a expressão de TGF-  $\beta$ 3 é significativamente maior se correlacionando com a progressão do câncer de mama (LI *et al.*, 1998).

A resistência a tratamentos radioterápicos pode ser conferida a partir da expressão de TGF-  $\beta$  pelas células do câncer de mama após serem expostas a doses mínimas de radiação. As diferentes expressões das isoformas de TGF-  $\beta$  descobertas, sendo o TGF-  $\beta$ 2 e TGF-  $\beta$ 3 aumentados cerca de dez vezes após a irradiação, induz um aumento na capacidade das células em se proliferar (YADAV; SHANKAR, 2019).

## 2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, programas de prevenção para o câncer de colo de útero vêm sendo difundidos através dos meios de comunicação, como a vacinação contra o Papilomavírus humano (HPV) e o uso de preservativos. Contudo, em países onde o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) é baixo, como em alguns países da África, ainda existem barreiras para que esses programas obtenham resultados (NGOMA; AUTIER, 2019).

O perfil de resposta Th1 induzido pelas citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12 está diretamente relacionado à eliminação de patógenos intracelulares (HÖLSCHER, 2004). Foi descoberto que células da resposta imune no tumor cervical apresentam principalmente o fenótipo Th2, devido à produção de IL-4 e TGF- $\beta$  pelas células tumorais. Este é um mecanismo imunossupressor que diminui a produção de IFN- $\gamma$  e a ativação de macrófagos (PEGHINI *et al.*, 2012).

O TGF- $\beta$ , por ser uma citocina pleiotrópica pode apresentar funções tanto benéficas, controlando a proliferação celular, quanto “maléficas” inibindo as respostas de perfil Th1 em ambientes infectados por vírus, como o HPV. Em certo momento da infecção, as células perdem a sensibilidade em responder ao controle proliferativo da citocina, passando elas mesmas a produzir em benefício próprio (XUE *et al.*, 2020).

Um estudo demonstrou redução na síntese e expressão do TGF- $\beta$  nas neoplasias intraepiteliais cervicais, mas não apresentou correlação para identificar qual isoforma estaria relacionada com a progressão ou regressão das lesões (ELSHERIF *et al.*, 2000). Portanto, é importante que estudos sejam feitos para analisar componentes do microambiente tumoral que podem induzir uma progressão de uma lesão neoplásica para um carcinoma invasivo.

### **3 OBJETIVO**

Determinar os níveis de expressão gênica das isoformas TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3 responsáveis pela progressão e/ou regressão das neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) de diferentes graus e em câncer invasivo do colo uterino.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

1. Verificar se as pacientes com diferentes graus de lesões intraepiteliais expressam apenas uma isoforma ou as três juntas.
2. Quantificar as expressões e tentar uma associação das isoformas com a progressão e/ou regressão das lesões NIC I, NIC II, NIC III e Câncer Cervical

### **4 METODOLOGIA**

#### **4.1 Sujeitos do Estudo**

Foi realizado um estudo transversal retrospectivo no departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Ambulatório Maria da Glória e no Instituto de Pesquisa em Oncologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Foram recrutadas para o estudo pacientes voluntárias com diagnóstico de NIC I, NIC II, NIC III e Câncer Invasivo, submetidas à coleta de biópsias. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sob o parecer 683 de 10/03/2006.

Os critérios para a inclusão das pacientes foram: sem atividade sexual por pelo menos dois dias antes do dia da coleta; sem uso de antibióticos orais, fungicidas ou cremes vaginais nos últimos 30 dias; ausência de sangramento durante o exame e sem histórico de tratamento para HPV anteriormente. Foram 56 pacientes incluídas e distribuídas de acordo com o tipo de

lesão apresentada. Sendo assim: grupo controle (Leiomioma) (n=9), NIC I (n=8), NIC II (n=11), NIC III (n=13) e Câncer Cervical (n=15).

#### 4.2 Extração de DNA, RNA e Proteínas

O protocolo de extração foi realizado seguindo os parâmetros de extração fenol-clorofórmio através do reagente TRIZOL<sup>®</sup> (Ambion<sup>®</sup>). Foi realizado a síntese de c-DNA, a partir do RNA extraído, utilizando a enzima (Superscript II<sup>®</sup> Transcriptase Reversa) que usa a fita de RNA para produzir a fita de DNA complementar conhecido como Transcriptase Reversa (Rt). Foi utilizado a técnica proposta pelo fabricante do Kit Promega GoScript<sup>™</sup> Reverse Transcription System.

#### 4.3 Rt-PCR e Eletroforese em gel de Poliacrilamida

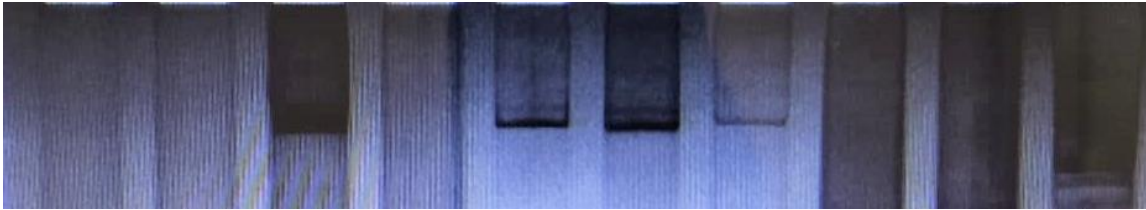
Para a amplificação das regiões alvos, foi seguido o protocolo que se inicia com a desnaturação da fita a 94°C por 40 segundos, anelamento dos *primers sense* e *anti-sense* respeitando a temperatura específica de cada *primer* (ver quadro 1) por 40 segundos. Para a etapa de extensão foi utilizado 72°C por 45 segundos, e a etapa final foi a 72°C por 10 minutos seguido do resfriamento a 4°C por tempo indeterminado. O kit usado foi Taq DNA Polymerase da Invitrogen<sup>®</sup>.

Gene	<i>Primer sense</i>	<i>Primer anti-sense</i>	Temperatura
$\beta$ actina	5'-CAC TCT TCC AGC CTT CCT TCC-3'	5'-CGG ACT CGT CAT ACT CCT GCT T-3'	56°C
TGF- $\beta$ 1	5'- ACC AAC TAT TGC TTC AGC TC- 3'	5'- TTA TGC TGG TTG TAC AGG-3'	60°C
TGF $\beta$ 2	5'- CTG TCC CTG CTG CAC TTT TGT-3'	5'- TCT TCC GCC GGT TGG TCT GTT-3'	59,5°C
TGF $\beta$ 3	5'- CCT TTC AGC CCA ATG GAG AT-3'	5'- ACA CAG CAG TTC TCC TCC AA- 3'	61,3°C

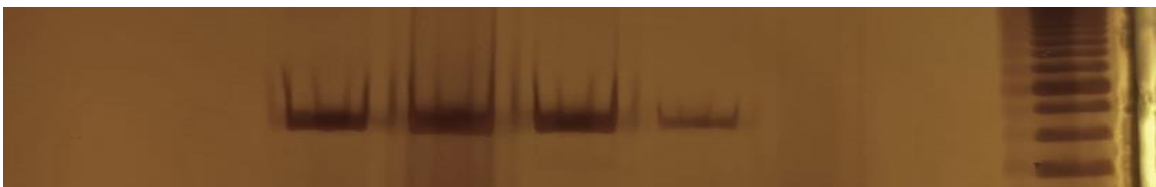
**Quadro 1: Primers e temperaturas.** Sequência de *primers* para a amplificação dos genes alvos com as suas respectivas temperaturas. **Fonte:** (Autora, 2019)

Após a realização do RT-PCR, os produtos foram visualizados através da técnica de Eletroforese em gel de Poliacrilamida a 10% e corados com nitrato de prata a 2 %. Para a

identificação das bandas amplificadas, utilizamos um padrão de peso molecular de 50pb Trackit™ 1kb DNA ladder da Invitrogen®. A corrida foi realizada a 90 volts em mais ou menos 1:30h seguido do processo de revelação com a solução fixadora por 20 minutos, nitrato de prata 20 minutos, lavagem rápida e por último a solução reveladora por 20min. Após a revelação foi realizado a captura de imagens no equipamento CARESTREAM Gel Logic Imaging System, em filtro UV. Exemplos das corridas realizadas abaixo:



**Figura 5: Amplificação do gene  $\beta$ -actina.** Resultado das amplificações para pacientes com lesões NIC III. **Fonte:** (Autora, 2020)



**Figura 6: Amplificação do gene TGF $\beta$ 3.** Resultado das amplificações para pacientes com lesões NIC III. **Fonte:** (Autora, 2020)

Para a quantificação dos genes alvos, foram seguidos os protocolos de amplificações propostos pelo Kit Promega GoTaq® qPCR Master Mix, respeitando as temperaturas padronizadas para os *primers* de cada gene alvo. O equipamento utilizado para a realização da técnica foi AB Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR System. O software utilizado foi SDS 2.4. O exemplo de mistura (Mix) que utilizamos foi:

- Água RNase free (q.s.p) 25 $\mu$ L
- Primer F 0,6  $\mu$ L
- Primer R 0,6  $\mu$ L
- Go Taq 12,5  $\mu$ L
- CXR 0,2  $\mu$ L
- cDNA 1,2  $\mu$ L

#### 4.4 Análise Estatística

O software GraphPad Prism 8 foi utilizado para realizar os testes estatísticos. Para testar a distribuição das amostras foi utilizado o teste Shapiro-Wilk. Para testar proporcionalidade dentro das amostras foi utilizado o teste Chi-square ( $\chi^2$ ). Para a comparação entre os grupos, aplicamos Kruskal-Wallis com pós- teste Dunn's. Os resultados foram expressos em mediana (min-max) e  $p < 0.05$  foi considerado significativo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Artigo

#### **Differential expression of TGF- $\beta$ Isoforms in Cervical Neoplasia** **Expressão diferencial das isoformas de TGF- $\beta$ em Neoplasia Cervical**

#### **Authors**

Kézia Jesus Aguiar Ferreira<sup>1</sup>, Jéssica Ferreira Vieira<sup>1</sup>, Ana Christina Macedo Barcellos<sup>1,2</sup>, Eddie Fernando Candido Murta<sup>1,2</sup>, Márcia Antoniazi Michelin<sup>1,3</sup>

#### **Authors affiliations**

<sup>1</sup> Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – UFTM.

<sup>3</sup> Disciplina de Imunologia – UFTM.

Work developed at the Instituto de Pesquisa em Oncologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Avenida Guilherme Ferreira nº1940, CEP 38022-200, São Benedito, Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

**Corresponding Author:** Marcia Antoniazi Michelin, Oncology Research Institute, Federal University of Triangulo Mineiro, Avenida Guilherme Ferreira nº1940, CEP 38022-200, São Benedito, Uberaba, Minas Gerais, Brazil. E-mail: marcia.michelin@uftm.edu.br (M. A. Michelin), ORCID: 0000-0003-0842-8805.

#### **Information about other authors**



Kézia Jesus Aguiar Ferreira, e-mail: [keziaaguiar91@gmail.com](mailto:keziaaguiar91@gmail.com); ORCID: 0000-0001-8999-976X.

Jéssica Ferreira Vieira, e-mail: [jessica.vieira@uftm.edu.br](mailto:jessica.vieira@uftm.edu.br); ORCID: 0000-0003-3556-9849.

Ana Cristina Macedo Barcelos, e-mail: [anacrisbarcelos@hotmail.com](mailto:anacrisbarcelos@hotmail.com); ORCID:0000-0001-5612-7009

Eddie Fernando Cândido Murta, e-mail: [eddiemurta@mednet.com.br](mailto:eddiemurta@mednet.com.br); ORCID: 0000-0003-4014-1345

### **Conflicts of interest statement**

There is no conflict of interest to report.

### **Author's contribution**

Márcia A. Michelin and Eddie F. C. Murta designed study. Kézia J. A. Ferreira, Ana Cristina M. B., and Jéssica F. Vieira collected data and performed the experiments. Kézia J. A. Ferreira, Jéssica F. Vieira and Márcia A. Michelin performed statistical analyzing and wrote the paper. All authors were involved with the conduction and interpret the data, read and approved the final manuscript.

**Resumo**

As três isoformas do TGF- $\beta$  têm funções distintas na resposta imune. Entender suas participações no desenvolvimento do tumor é essencial para gestão do câncer, bem como avaliação de marcadores biológicos de progressão da lesão. **Objetivo:** Quantificar e correlacionar a expressão das isoformas TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3 em diferentes graus de lesões de NIC e câncer invasivo. **Métodos:** Utilizando a técnica qPCR, 56 pacientes, grupos Controle (n = 09), NIC I (n = 08), NIC II (n = 11), NIC III (n = 13) e Câncer Cervical (n = 15) foram avaliados para essas isoformas. **Resultados:** TGF- $\beta$ 1 apresentou expressão aumentada no grupo Controle (p = 0,0002). As isoformas TGF- $\beta$ 2 (p=0,3496) e TGF- $\beta$ 3 (p=0,2810) não apresentaram relevância estatística na sua expressão. **Conclusão:** A baixa expressão da isoforma TGF- $\beta$ 1 pode estar relacionada à progressão da lesão, podendo ser utilizada como marcador no monitoramento do tratamento e alvo para futuras imunoterapias.

**Palavras-chave:** Neoplasia Cervical. Câncer cervical. Isoformas TGF- $\beta$ .

**Abstract**

The three isoforms of TGF- $\beta$  have distinct functions in the immune response. Understanding your participation in tumor development is essential for cancer management and assessing biological markers of lesion progression. **Objective:** Quantifying and correlate the expression of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, and TGF- $\beta$ 3 isoforms in CIN lesions and cervical cancer. **Methods:** By qPCR, 56 patients, groups Control (n=09), CIN I (n=08), CIN II (n=11), CIN III (n=13) and Cervical Cancer (n=15) were evaluated for TGF- $\beta$  isoforms. **Results:** TGF- $\beta$ 1 showed increased expression in the Control group (p=0.0002). The TGF- $\beta$ 2 (p=0.3496) and TGF- $\beta$ 3 (p=0.2810) did not have expressions statistically significant. **Conclusion:** The low expression of the TGF- $\beta$ 1 may be related to the lesion's progression and can be used as a marker in the treatment monitoring and target for future immunotherapies.

**Keywords:** cervical neoplasia. Cervical cancer. TGF- $\beta$  isoforms.

## **Introduction**

Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) is mostly caused by high-risk Human Papilloma Virus (HPV), which can progress to invasive cervical cancer <sup>(1)</sup>. The HPV 16 type has been the main cause of injuries, with 55% to 60% of cancer cases. When persisting for several years, HPV can induce high- grade lesions and when left untreated there is a high percentage of chances of becoming invasive cancer <sup>(2)</sup>.

In a previous study, our group found evidence that biopsies of patients in the control group (without HPV and NICs) showed high expressions of cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-12 characteristic of the responses of the Th1 profile compared to the groups with dysplasia <sup>(3)</sup>. During HPV infection, inflammation and necrosis present in the cervix leads to an increase in leukocytes and neutrophils and a decrease in lymphocytes in absolute numbers. Thus, there is a deficiency in the production of cytokines of the Th1 response profile <sup>(4)</sup>.

Therefore, pro-inflammatory cytokines such as IL-12, IL-2, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  were found less frequently in dysplasia caused by HPV, which are of paramount importance in the eradication of intracellular pathogens and potential activators of cell-mediated immunity <sup>(3)</sup>. Some cytokines produced by immature cells assist in tumor escape, as like IL-10 and TGF- $\beta$ , which provide a favorable inflammatory medium for tumor growth, thus suppressing antitumor responses <sup>(5)</sup>.

TGF- $\beta$  is a protein expressed in almost all cell types and normal or precancerous cells. It can stop the proliferation process, however, in cancer cells, it promotes metastasis <sup>(6,7)</sup>. TGF- $\beta$  is part of a superfamily composed of about 40 members, segregated according to their structural similarities. It is characterized by a subfamily composed of three isoforms:  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\beta$ 3 <sup>(8)</sup>.

It is of fundamental importance to understand which immunological mechanisms trigger the lesions in CIN and invasive cancer, as this way, we can infer new and more effective immunotherapies and we will have a biological marker that can predict which patients presented tumor progression. Therefore, the objective of this work was to quantify the gene expression of the isoforms of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, and TGF- $\beta$ 3 correlating with the different degrees of intraepithelial cervical lesions (CIN I, CIN II, and CIN III), invasive cancer, and control.

## **Methods**

### ***Research subjects***

The study was carried out at the Maria da Gloria Ambulatory, Discipline of Gynecology and Obstetrics, Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) and included 56 women

distributed according to the studied groups: Control (n=09), CIN I (n=08), CIN II (n=11), CIN III (n=13) and cervical cancer (n=15). The inclusion criteria applied were: no sexual activity for at least two days before the collection day; no use of oral antibiotics, fungicides, or vaginal creams in the last 30 days; no bleeding during the examination and no history of treatment for HPV previously. For the composition of the control group, patients with negative tests for CIN and HPV were considered. For all patients, the Informed Consent Form was presented and signed. The techniques used followed the Research Ethics Committee (CEP), protocol number 683-2006.

For the analysis of gene expressions of TGF- $\beta$  isoforms, biopsies were collected from all patients, stored in TRIzol® Reagent (Invitrogen™) for the extraction of RNA.

### ***RT-qPCR- (Reverse Transcription and Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction)***

The RNA extraction protocol was according to the manufacturer Trizol®. The synthesis of cDNA was performed from the extracted RNA using the technique proposed by GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega®). From the obtained cDNA, amplifications were performed to quantify the target genes using the Promega GoTaq® qPCR Master Mix Kit. The primers with the respective annealing temperatures that were used are:  $\beta$ -actin -(F) 5'-CAC TCT TCC AGC CTT CCT TCC-3', (R) 5'-CGG ACT CGT CAT ACT CCT GCT T-3', 56°C; TGF- $\beta$ 1, (F) 5'-ACC AAC TAT TGC TTC AGC TC-3', (R) 5'- TTA TGC TGG TTG TAC AGG-3', 60°C; TGF- $\beta$ 2, (F) 5'- CTG TCC CTG CTG CAC TTT TGT-3', (R) 5'- TCT TCC GCC GGT TGG TCT GTT-3', 59,5°C; TGF- $\beta$ 3, (F) 5'- CCT TTC AGC CCA ATG GAG AT-3', (R) 5'- ACA CAG CAG TTC TCC TCC AA-3', 61,3°C.

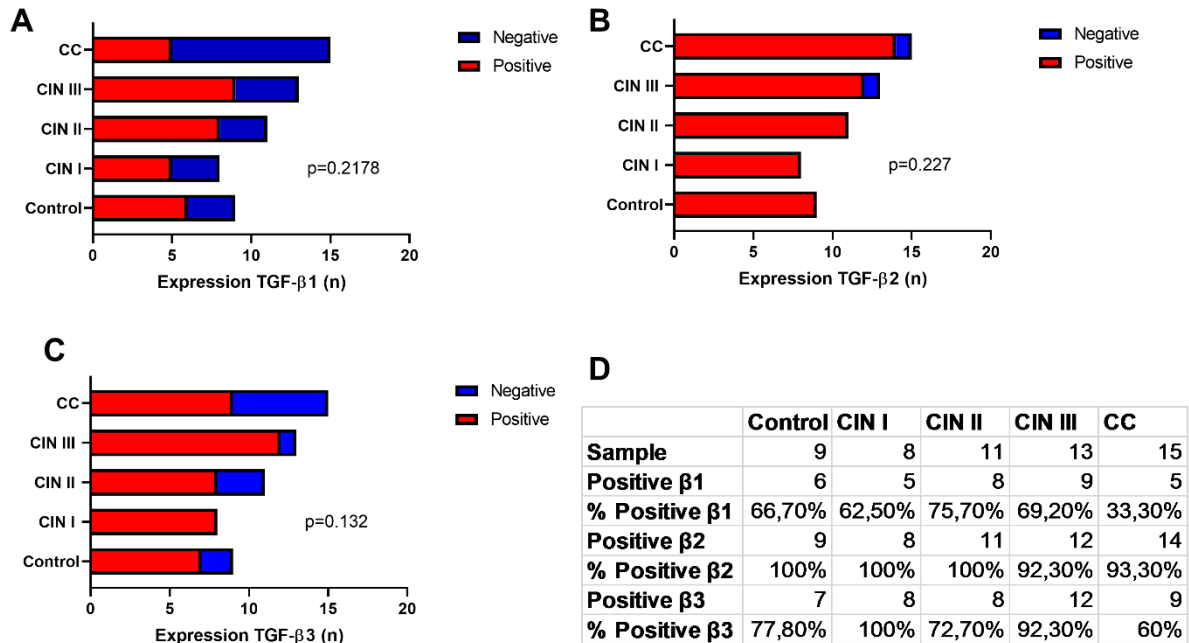
### ***Statistical analysis***

Data were assessed for normality distribution by Shapiro-Wilk. Proportion were compared using the Chi-square ( $\chi^2$ ) test. To compare the groups, we applied Kruskal-Wallis with Dunn's post-test. The results are expressed in median (min-max).  $p < 0.05$  was considered significant.

### **Results**

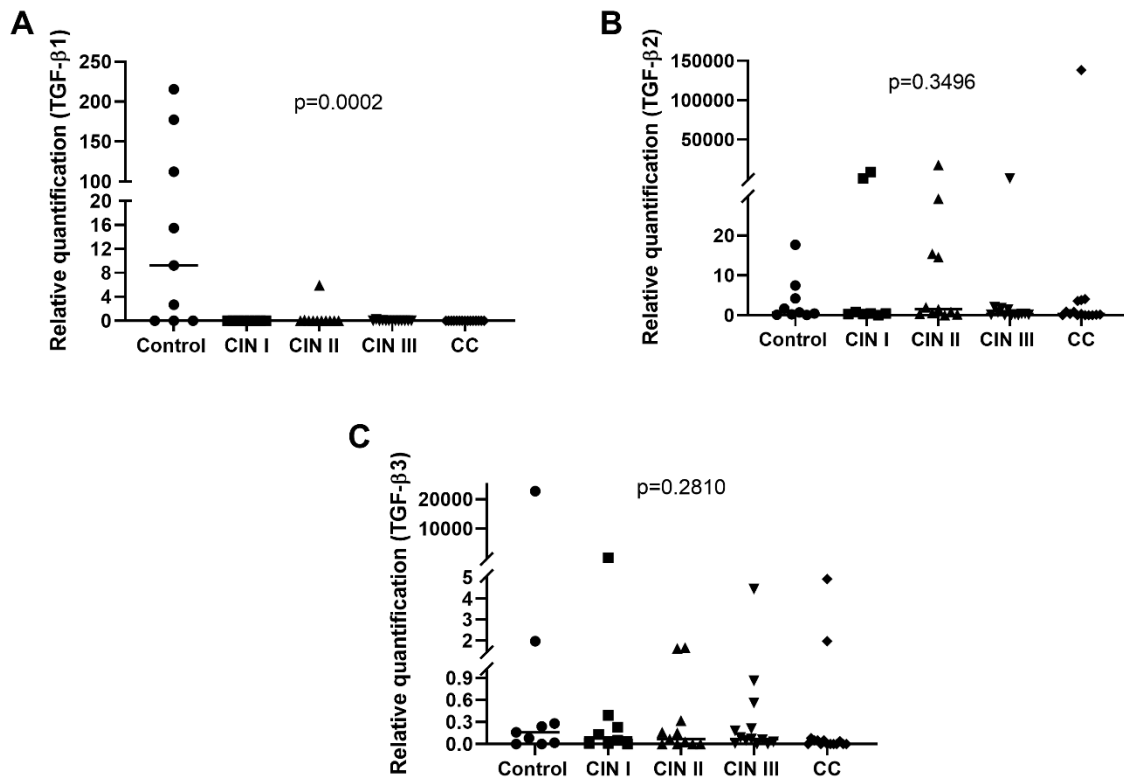
In the proportion of positive samples for each isoform, although the data is not statistically significant, we observed for the TGF- $\beta$ 1 isoform that CIN II was the group that had

the most positive samples (Figure 1A). The TGF- $\beta$ 2 isoform was expressed qualitatively in all samples in the Control, CIN I, and CIN II groups (Figure 1B). The TGF- $\beta$ 3 isoform was expressed in all samples in the CIN I group, followed by the CIN III group that had the highest number of positive samples (Figure 1C).



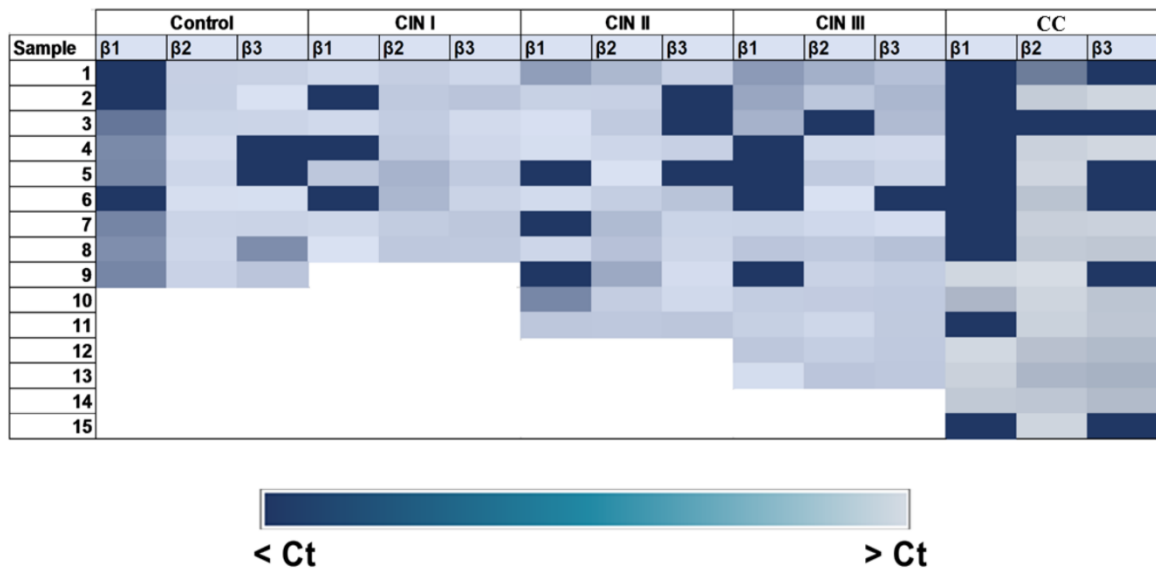
**Figure 1. Proportion of gene expression of TGFs isoforms.** Graphical representation of the gene expression of the TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, and TGF $\beta$ 3 isoforms in the Control, CIN I, CIN II, CIN III, and CC Invasive groups

To quantify the expression of TGF- $\beta$  isoforms, qPCR of all biopsies was performed. So, when we evaluated the expressions of the isoforms by groups, we found that TGF- $\beta$ 1 was more expressed in the Control group ( $p=0.0002$ ). Statistical significance was found in the comparison of the Control group with the groups CIN I, CIN II, CIN III, and Invasive Cancer (Figure 2A). For the TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 isoforms, we did not find statistical significance in the number of expressions identified in all groups (Figure 2B, C).



**Figure 2. Quantitative gene expression of TGF isoforms.** Graphical representation of the gene expression of the TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, and TGF- $\beta$ 3 isoforms in the Control, CIN I, CIN II, CIN III, and CC Invasive groups

The expression of the TGF- $\beta$  isoforms is displayed on the hit map (Figure 3) according to Ct (Cycle Threshold). Light colors indicate higher Ct and that amplification started later, which means that the target gene was poorly expressed. The strong colors indicate lower Ct, which could indicate that the sample was more expressed. That is, the lower the start Ct in the amplification plot, the greater the target load to be amplified.



**Figure 3. Hit Map Ct of the TGFβ isoforms.** Graphical representation of the gene expression of the TGFβ1, TGFβ2, and TGFβ3 isoforms in the Control, CIN I, CIN II, CIN III, and CC Invasive groups

### Discussion

The TGF-β inhibits the proliferation and activation of T lymphocytes, thus inhibiting the differentiation and function of the cell population. It also inhibits the expression of granzyme A, granzyme B, perforin, ligand Fas, and Interferon-γ that act together promoting the cytotoxicity of tumor cells mediated by T lymphocytes. TGF-β can inhibit the proliferation of Helper T lymphocytes (CD4+) acting on macrophages. Although TGF-β is expressed in different cell populations, including tumor cells and the tumor microenvironment, regulatory T lymphocytes can secrete this cytokine, inhibiting Cytotoxic T lymphocytes (CD8+) <sup>(9, 10, 11)</sup>.

Overexpression of TGF-β in patients with gastric cancer has been associated with low survival due to radioresistance conferred by TGF-β <sup>(12)</sup>. In patients with osteosarcomas, high TGF-β expression was associated with the presence of metastasis and recurrence of bone cancer <sup>(13)</sup>. In a previous study by our group, we found high expression of TGF-β isoforms in high-grade CIN and invasive cancer <sup>(3)</sup>.

The TGF-β1 isoforms are commonly found in cartilage, bones, skin, and endochondral tissues, and are responsible for interrupting the epithelial cell cycle and controlling hematopoiesis <sup>(14)</sup>. Our data show the high expression of TGF-β1 in the control group (disease-free) when compared to the groups CIN I, CIN II, CIN III, and cervical cancer.

In a study conducted with women from the state of Pernambuco, Brazil, no association was found between TGF-β1 polymorphisms and the susceptibility and progression of low- and

high-grade lesions to invasive lesions <sup>(15)</sup>. However, another study has shown that polymorphisms in the TGF- $\beta$ 1 signal peptide can predispose to HPV infection in addition to a specific polymorphism genotype that can lead to the progression of high-grade NICs <sup>(16)</sup>.

In a vaccine trial, where a tumor line was used with the presence of proteins E6 and E7 (TC-1), it was observed that mice immunized with anti-TGF $\beta$ 1 and anti-E7 antibodies combined, showed tumor suppression, increased cytokines of the Th1 response profile such as IFN- $\gamma$  and cytotoxic T lymphocytes <sup>(17)</sup>.

The presence of polymorphisms in the TGF- $\beta$ 1 (low expression) isoform may be related to the progression of the lesions, therefore, it will be investigated in a next study, increasing the number of patients in the Control, CIN I, CIN II, CIN III, and Cervical Cancer groups.

The TGF- $\beta$ 2 isoform is more evident in astrocytes and neurons, and has a fundamental function of cell proliferation, due to the differentiation and proliferation of mesenchymal cells <sup>(8, 14)</sup>. Although not statistically significant, we found that in the groups CIN I and CINII we had samples that showed increased relative quantification of the TGF- $\beta$ 2 isoform, and it could have a clinical relevance.

The presence of HPV can promote the growth of TGF- $\beta$ 2 expression to increase the transcription of E6-E7 proteins. Thus, the increase in the expression of TGF- $\beta$ 2 mediated by HPV promotes cell growth and helps the virus in the remodeling of the peripheral microenvironment, through the production and discrimination of regulatory T cells <sup>(18)</sup>. Therefore, the expression of TGF- $\beta$ 1 was suppressed by HPV compared to TGF- $\beta$ 2, which was found to be increased in our data.

The TGF- $\beta$ 3 isoform is evidenced in lung tissues and functions in epithelial changes and chemical interactions that can occur in these tissues, in the production of extracellular matrix and immunosuppression <sup>(8, 14)</sup>. We observed that the expression of the TGF- $\beta$ 3 isoform was not statically significant in the studied groups, however, we found more positive samples for the TGF- $\beta$ 3 isoform in the CIN I and III group than in the other groups.

In models of murine breast tumors, a high expression of TGF- $\beta$ 3 was observed in tumor progression, which may infer a protective character against exacerbated healing responses of compromised and persistent wounds. The results support that the inhibition of TGF- $\beta$  pathways with specific inhibitors that protect TGF- $\beta$ 3 may confer an advantage in the treatment of breast cancer, when applicable for humans <sup>(19)</sup>.

Finally, this finding may open the way for the use of the TGF- $\beta$ 1 isoform as a biological marker for the progression of pre-neoplastic lesions. We also believe that the TGF- $\beta$ 1 isoform may be a target for future immunotherapies or the development of specific drugs that protect



the integrity of the cervix. This study should be extended to other populations and number of patients in each group, since isoforms are genetically expressed, and may vary from population to population. Another yes, it is necessary to investigate which subtypes of HPVs modulate the expression of isoforms to induce the escape of the immune response.

### **Conclusion**

We conclude that the lower expression of TGF- $\beta$ 1 isoform may be directly related to the progression of the lesions. Except for the Control group, the expression of the TGF- $\beta$ 1 isoform in the group's CIN I, CIN II, CIN III, and Invasive Cancer was decreased.

### **Acknowledgment**

The present study was supported by Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Foundation for Research Assistance of the State of Minas Gerais (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) and Uberaba Teaching and Research Foundation (Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba).

### **References**

1. WANG, L.; ZHU, L.; LI, H.; MA, N.; HUANG, H.; ZANG, X. et al. Association between asymptomatic sexually transmitted infections and high-risk human papillomavirus in cervical lesions. *Journal of International Medical Research*, 2019
2. SASLOW, D.; SOLOMON, D.; LAWSON, HERSHEL W.; KILLACKEY, M.; KULASINGAM, S.; CAIN, J. et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. v. 62, n. 3, p. 147-172, 2012.
3. PEGHINI, B. C.; ABDALLA, DOUGLAS R.; et al. Local cytokine profiles of patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia. *Human Immunology*, v. 73, n. 9, p. 920-926, 2012.
4. BAIS, A. G.; BECKMANN, E.; LINDERMANS, J.; EWING, PC.; MEIJER, CJLM. et al. A shift to peripheral Th2-type cytokine pattern during the

- carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *Journal of clinical pathology*, v. 58, p. 1096-100, 2005.
5. KOBAYASHI, A.; WEINBERG, V.; DARRAG, T.; McCUNE, K. SMITH. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. *Mucosal Immunology*, v. 1, n. 5, p. 412-420, 2008.
  6. ZI, Z.; CHAPNICK, D. A.; LIU, X. Dynamics of TGF- $\beta$  / Smad signaling. v. 586, n. 14, p. 1921-1928, 2012
  7. KWAŚNIAK, K.; CZARNIK-KWASNIAK, J.; MAZIARZ, A.; AEBISHER, D.; ZIELINSKA, K.; KARCZMAREK-BOROWSKA, B. et al. Scientific reports concerning the impact of interleukin 4, interleukin 10 and transforming growth factor  $\beta$  on cancer cells. *Cent Eur J Immunol*, v. 44, n. 2, p. 190-200, 2019
  8. HAQUE, S.; MORRIS, J. C. Transforming growth factor- $\beta$ : A therapeutic target for cancer. *Hum Vaccin Immunother*, v. 13, n. 8, p. 1741-1750, 2017
  9. THOMAS, D. A.; MASSAGUÉ, J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, v. 8, n. 5, p. 369-80, 2005
  10. MOO-YOUNG, T. A.; LARSON, JUSTIN W.; BELT, BRIAN A., TAN, MARCUS C.; HAWKING, WILLIAM G.; EBERLEIN, TIMOTHY J. et al. Tumor-derived TGF-beta mediates conversion of CD4 + Foxp3 + regulatory T cells in a murine model of pancreas cancer. *J Immunother*, v. 32, n. 1, p. 12-21, 2009
  11. SEOANE, J.; GOMIS, R. R. TGF- $\beta$  Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, Vol. 9, n. 12, 2017
  12. YANG, T.; HUANG, T.; ZHANG, D.; WANG, M.; WU, B.; SHANG, Y. et al. TGF- $\beta$  receptor inhibitor LY2109761 enhances the radiosensitivity of gastric cancer by inactivating the TGF- $\beta$  / SMAD4 signaling pathway. *Aging (Albany NY)*, v. 11, n. 20, p. 8892-8910, 2019
  13. MA, K.; ZHANG, C.; LI, W. TGF- $\beta$  is associated with poor prognosis and promotes osteosarcoma progression via PI3K / Akt pathway activation. *Cell Cycle*, v. 19, n. 18, p. 2327-2339, 2020
  14. CHEIFETZ, S.; WEATHERBEE, JA.; TSANG, ML.; ANDERSON, JK.; MOLE, JE.; LUCAS, R. et al. The transforming growth factor- $\beta$  system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell*, v. 48, n. 3, p. 409-415, 1987
  15. LIMA, S. F. J.; TAVARES, M. M. F.; MACEDO, J. L.; OLIVEIRA, R. S.; HERÁCLIO, S. A.; MAIA, M. M. D. et al. Influence of IL-6, IL-8, and TGF- $\beta$ 1 gene

- polymorphisms on the risk of human papillomavirus-infection in women from Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 111, n. 11, p. 663-669, 2016
16. TRUGILO, K. P.; CEBINELLI, G. C. M.; BERTI, F. C. B.; OKUYAMA, N. C. M.; CEZAR-DOS-SANTOS, F.; SENA, M. M. et al. Polymorphisms in the TGFB1 signal peptide influence human papillomavirus infection and development of cervical lesions. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 208, n. 1, p. 49-58, 2019
17. CHU, X.; LI, Y.; HUANG, W.; FENG, X.; SUN, P.; YAO, Y. et al. Combined immunization against TGF- $\beta$ 1 enhances HPV16 E7specific vaccine-elicited antitumor immunity in mice with grafted TC-1 tumors. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, Vol. 46, n. sup2, p. 1199-1209, 2018
18. WOODYBY, B. L.; SONGOCK, W. K.; SCOTT, M. L.; RAIKHY, G.; BODILY, J. M. Induction of Interferon Kappa in Human Papillomavirus 16 Infection by Transforming Growth Factor Beta-Induced Promoter Demethylation. *J Virol*, vol. 92, n. 8, 2018.
19. FLANDERS, K. C.; YANG, YU-AN.; HERRMANN, M.; CHEN, JINQIU; MENDOZA, N.; MIRZA, A. M. et al. Quantitation of TGF- $\beta$  proteins in mouse tissues shows reciprocal changes in TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3 in normal vs neoplastic mammary epithelium. *Oncotarget*, v. 7, n. 25, p. 38164-38179, 2016.

## 6 COMENTÁRIOS FINAIS

Observamos que a isoforma TGF- $\beta$ 1 é menos expressa dentro dos graus de lesões do que no grupo controle (livre de doença e HPV). Pode ser essa a chave para que novas terapias que preservem a integridade uterina, sejam discutidas. Além disso, pode-se discutir a utilização da isoforma como um marcador biológico na tentativa de prever a resposta da paciente ao tratamento na qual foi submetida.

Seria interessante, investigar a ativação dos receptores, fatores da cascata de ativação, investigação de prontuários para tentar uma associação do estilo de vida com a predisposição no desenvolvimento de lesões invasivas. Também seria interessante investigar a biodisponibilidade das isoformas, qual o papel da isoforma TGF-  $\beta$ 3 em um modelo de câncer cervical induzido por vírus. Os polimorfismos nas isoformas podem estar relacionados com a boa resposta imunológica como ao escape tumoral, seria outro ponto levantado em questão.

## 7 CONCLUSÕES

Com o estudo, foi possível concluir que:

1. Todas as pacientes expressaram pelo menos uma das isoformas.
2. O TGF- $\beta$ 1 pode estar correlacionado com a progressão, uma vez que, no grupo controle (livre de doença) temos uma maior expressão da isoforma. Enquanto nos grupos com lesões a isoforma está diminuída.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINIS, C. et al. Uterine Immunity and Microbiota: A Shifting Paradigm. **Front Immunol**, v. 10, p. 2387, 2019. ISSN 1664-3224.
- ARTEAGA, C.DUMONT, N; ARTEAGA, C. L. Targeting the TGF signaling network in human neoplasia. *Cancer Cell* 3, 531-536. **Cancer cell**, v. 3, p. 531-6, 07/01 2003.
- BAIS, A. G. et al. A shift to peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. **Journal of clinical pathology**, v. 58, p. 1096-100, 11/01 2005.
- BARRIOS DE TOMASI, J.; OPATA, M. M.; MOWA, C. N. Immunity in the Cervix: Interphase between Immune and Cervical Epithelial Cells. **Journal of immunology research**, v. 2019, p. 7693183-7693183, 2019
- BOCCARDO, E.; LEPIQUE, A. P.; VILLA, L. L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 11, p. 1905-1912, 2010.
- BRIANTI, P.; DE FLAMMINEIS, E.; MERCURI, S. R. Review of HPV-related diseases and cancers. **New Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 80-85, Apr 2017
- CHEIFETZ, S. et al. The transforming growth factor- $\beta$  system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. **Cell**, v. 48, n. 3, p. 409-415, 1987
- DENG, M. et al. CD36 promotes the epithelial-mesenchymal transition and metastasis in cervical cancer by interacting with TGF- $\beta$ . **J Transl Med**, v. 17, n. 1, p. 352, Oct 26 2019
- DIMAIO, D.; PETTI, L. M. The E5 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 99-114, 2013
- DOORBAR, J. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in medical virology**, v. 25 Suppl 1, n. Suppl Suppl 1, p. 2-23, 2015.
- DOORBAR, J. et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, p. F55-F70, 2012/11/20/ 2012.
- DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, v. 110, n. 5, p. 525-541, 2006.
- DOORBAR, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, v. 445, n. 1, p. 80-98, 2013.
- EL-SHERIF, A. M. et al. Decreased synthesis and expression of TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\beta$ 3 in epithelium of HPV 16-positive cervical precancer: a study by microdissection, quantitative RT-PCR, and immunocytochemistry. v. 192, n. 4, p. 494-501, 2000.
- GUO, P. et al. Nuclei-Based Features for Uterine Cervical Cancer Histology Image Analysis With Fusion-Based Classification. **IEEE journal of biomedical and health informatics**, v. 20, n. 6, p. 1595-1607, 2016.

HAQUE, S.; MORRIS, J. C. Transforming growth factor- $\beta$ : A therapeutic target for cancer. **Hum Vaccin Immunother**, v. 13, n. 8, p. 1741-1750, 2017

HE, A.-D. et al. Platelet derived TGF- $\beta$ 2; promotes cervical carcinoma cell growth by suppressing KLF6 expression. v. 8, n. 50, 2017.

HÖLSCHER, C. The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 193, n. 1, p. 1-17, 2004.

ISMAIL, S. M. et al. Reporting cervical intra-epithelial neoplasia (CIN): Intra- and interpathologist variation and factors associated with disagreement. v. 16, n. 4, p. 371-376, 1990.

JACOBS, N. et al. Distinct T Cell Subsets and Cytokine Production in Cultures Derived from transformation Zone and Squamous Intraepithelial Lesion Biopsies of the Uterine Cervix. v. 49, n. 1, p. 6-13, 2003

KATZ, L. H. et al. Targeting TGF- $\beta$  signaling in cancer. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 17, n. 7, p. 743-760, 2013.

KIM, S. et al. Elevated TGF- $\beta$ 1 and - $\beta$ 2 expression accelerates the epithelial to mesenchymal transition in triple-negative breast cancer cells. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 151-158, 2015

LI, C. et al. Role of transforming growth factor  $\beta$ 3 in lymphatic metastasis in breast cancer. v. 79, n. 5, p. 455-459, 1998.

LIN, W. et al. Imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg during the development of uterine cervical cancer. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 12, n. 9, p. 3604-3612, 2019. ISSN 1936-2625.

MA, J. et al. Low Transforming Growth Factor- $\beta$ 3 Expression Predicts Tumor Malignancy in Meningiomas. **World Neurosurgery**, v. 125, p. e353-e360, 2019

MASSAGUÉ, J. Tgf-B Signal Transduction. v. 67, n. 1, p. 753-791, 1998.

MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E. Human Papillomaviruses and Non-melanoma Skin Cancer. **Seminars in Oncology**, v. 42, n. 2, p. 284-290, 2015.

METELLI, A. et al. Thrombin contributes to cancer immune evasion via proteolysis of platelet-bound GARP to activate LTGF- $\beta$ . v. 12, n. 525, p.4860, 2020

MICHELIN, M. A. et al. Helper T lymphocyte response in the peripheral blood of patients with intraepithelial neoplasia submitted to immunotherapy with pegylated interferon- $\alpha$ . **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 3, p. 5497-509, 2015

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. v. 348, n. 6, p. 518-527, 2003.

NEES, M. et al. Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Proteins Inhibit Differentiation-dependent Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$ 2 in Cervical Keratinocytes. v. 60, n. 15, p. 4289-4298, 2000.

NGOMA, M.; AUTIER, P. Cancer prevention: cervical cancer. **Ecancermedicalsecience**, v. 13, p. 952, 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE- Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: Manual para principiantes, J.W Sellors e R. Sankaranarayanan.

C.1. Disponível em:

<<https://screening.iarc.fr/colpochap.php?chap=1&lang=4#:~:text=A%20ectoc%C3%A9rvix%20%C3%A9%20recoberta%20por,do%20epit%C3%A9lio%20escamoso%20cont%C3%AAm%20glicog%C3%AAnio.>> Acesso em: 2021

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global cancer observatory. **Iarc**, 2020

PEGHINI, B. C. et al. Local cytokine profiles of patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia. **Human Immunology**, v. 73, n. 9, p. 920-926, 2012.

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 Zone1. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 6, p. 1253-1263, 2005.

SASLOW, D. et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. v. 62, n. 3, p. 147-172, 2012.

SOLOMON, D. **THE BETHESDA SYSTEM FOR REPORTING CERVICAL CYTOLOGY**. 3. SPRINGER: 2015 Disponível em: <

<<https://link.springer.com/content/pdf/bfm%3A978-3-319-11074-5%2F1.pdf>> Acesso em: 2021

SORNAPUDI, S. et al. Deep Learning Nuclei Detection in Digitized Histology Images by Superpixels. **Journal of pathology informatics**, v. 9, p. 5-5, 2018

TORRES-POVEDA, K. et al. Role of IL-10 and TGF- $\beta$ 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 4, p. 753-763, 2014.

TRIFONOVA, R. T.; LIEBERMAN, J.; VAN BAARLE, D. Distribution of immune cells in the human cervix and implications for HIV transmission. **Am J Reprod Immunol**, v. 71, n. 3, p. 252-64, Mar 2014. ISSN 1046-7408

TUMMERS, B.; BURG, S. H. High-risk human papillomavirus targets crossroads in immune signaling. **Viruses**, v. 7, n. 5, p. 2485-506, 2015.

VILORIA, M. E. et al. In situ expressions of protein 16 (p16CDKN2A) and transforming growth factor beta-1 in patients with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 228, p. 303-307, 2018.

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

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11-22, 2007/01/01 2007. ISSN 1474-1768.

XUE, V. W. et al. Transforming Growth Factor- $\beta$ : A Multifunctional Regulator of Cancer Immunity. **Cancers (Basel)**, v. 12, n. 11, 2020. ISSN 2072-6694

YADAV, P.; SHANKAR, B. S. Radio resistance in breast cancer cells is mediated through TGF- $\beta$  signalling, hybrid epithelial-mesenchymal phenotype and cancer stem cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 119-130, 2019



**Anexo-** Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM (683-2006/CEP)



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)  
COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP

**Parecer Consubstanciado**

PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

**IDENTIFICAÇÃO**

**TÍTULO DO PROJETO: IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS NO CÂNCER INVASIVO DO COLO UTERINO**

**PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL:** Eddie Fernando Cândido Murta

**INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA:** UFTM

**DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM:** 09-03-2006 PROTOCOLO CEP/UFTM:

**8 RETORNO DE BENEFÍCIOS PARA O SUJEITO E/OU PARA A COMUNIDADE**

As pacientes que farão parte deste estudo são aquelas nas quais os tratamento por quimio, radioterapia ou cirurgia não apresentaram resultado, tendo portanto uma chance de apenas 10-20% de sobrevida. De acordo com a literatura, a terapia com células dendríticas não apresenta nenhum efeito colateral, contudo o acompanhamento clínico das pacientes será realizado periodicamente. A terapia com IFN-alpha já tem sido utilizada para o tratamento de outras doenças e os efeitos colaterais são conhecidos, plaquetopenia, sintomas similares ao estado gripal, mialgia, que podem ser facilmente tratados, sendo o benefício maior que os efeitos colaterais.

9. **JUSTIFICATIVA DE SUSPENSÃO TERAPÊUTICA ("Wash out")** - Não pertinente. Este projeto será encerrado quando de sua conclusão ou se algum procedimento proposto passar a representar risco para o paciente.

10. **JUSTIFICATIVA DO USO DE PLACEBO** - Não pertinente.

**11. ORÇAMENTO FINANCEIRO DETALHADO DA PESQUISA**

O valor total do projeto será de R\$ 99.000,00. O projeto será apresentado ao órgão de fomento.

12. **FORMA E VALOR DA REMUNERAÇÃO DO PESQUISADOR** Salário de professor titular quarenta horas e bolsista do CNPq nível 1.

**13. ADEQUAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIIVIENTO E FORMA DE OBTÊ-LO**

O consentimento livre e esclarecido será obtido quando da coleta pelo profissional responsável por esta. 14. **ESTRUTURA DO PROTOCOLO** — O protocolo foi adequado para atender às determinações da Resolução CNS 196/96.

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

Trabalho importante do ponto de vista prático e de pesquisa para a sociedade.

**PARECER DO CEI**  
*Assinado* P

(O relatório anual ou

João Batista Ribeiro  
Relator

final deverá se encaminhado um  
início do processo).  
DAT DA REUNIÃO v p BLuc

João Batista Ribeiro  
Coordenador

ano após o

Avenida Frei Paulino, 30 2. andar - CEA - Abadia - 38025-180-Uberaba-MG - Telefax E mail:  
cep@prodepe.uftm.edu.br

## MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO



- 0(0\*\*34)33

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Disciplina de Ginecologia e Obstetria

Instituto de Pesquisa em Oncologia IPON

Av. Getúlio Guarita, s/n — Bairro Abadia- 38,025440

Uberaba MG  
Tel 55 34 3318 5595  
ipon@amg.uftm.edu.br

Mem 09/08/1PON/UFTM

Uberaba, 10 de Junho de 2008

Ao Sr. João Batista Ribeiro Coordenador do CEP-UFTM

Prezado Coordenador,

Venho por meio deste solicitar que no Parecer Consubstanciado (Parecer 683 de 10/03/2006), que trata de Imunoterapia com Células Dendríticas, sejam incluídos grupos de pacientes com neoplasias em outros órgãos, além do colo

uterino. A presente solicitação justifica-se pelo fato de que a terapia citada pode ser aplicada no tratamento de neoplasia em outros órgãos por se tratar da mesma metodologia e dos mesmos reagentes descritos anteriormente, constituindo-se em um avanço para pacientes cujas terapias convencionais não são possíveis de serem realizadas, ou que não apresentaram resultados clínicos.

Atenciosamente,

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)  
COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP  
Prof. Dr. Eddie Fe do Cândido Murta Prof. Titular — Disci-  
lina de Ginecologia e Obstetrícia Instituto de Pesquisa  
em Oncologia — IPON Coordenador do Projeto

*Aprovado*  
*13/06/08*  
João Batista Ribeiro  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM

Avenida Frei Paulino, 30 2. andar - CEA - Abadia - 38025-180-Uberaba-MG - Telefax E mail:  
cep@prodepe.ufm.edu.br