

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO ESTROMA CERVICAL DE
PACIENTES COM NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL DE
ALTO GRAU APÓS TRATAMENTO COM INTERFERON α -2B
INTRALESIONAL**

MARISA DE CARVALHO RAMOS

**UBERABA-MG
2009**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Expressão de citocinas no estroma cervical de pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau após tratamento com Interferon α -2b intralesional

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia, área de concentração “Patologia Geral”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Aluna: Marisa de Carvalho Ramos

Orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin

Uberaba-MG
Abril/2009

Dedicatória

Dedico este trabalho:

A Deus, por todas as bênçãos que iluminam minha vida.

Ao meu esposo François, pelo amor, companheirismo e apoio que sempre me fortaleceram.

A minha querida mãe Ilma (in memorian) por seu amor incondicional.

A minha irmã Marília pelo carinho, amizade e dedicação.

A minha afilhada Maria Luísa, pela alegria de tê-la em minha vida.

Ao estimado orientador Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta, pela oportunidade tão enriquecedora na minha formação.

Agradecimentos

Ao Professor, Dr. Eddie Fernando Cândido Murta, pelo estímulo à pesquisa, apoio e amizade. Meus sinceros agradecimentos.

À Professora, Dra. Márcia Antoniazi Michelin, pelo incentivo e co-orientação na realização deste estudo.

À Dra. Marília de Carvalho Mardegan, pela coleta das biópsias, pela valiosa colaboração na seleção das pacientes participantes deste estudo e pelos essenciais ensinamentos em oncologia ginecológica.

Às queridas amigas Daniela Rejane de Paula, Vilma Regina Resende e Marisângela Santos, pelo carinho e por estarem sempre presentes em minha vida.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Patologia, pelos ensinamentos transmitidos.

À Dra. Ana Cristina Macedo Barcelos por encaminhar as pacientes participantes deste estudo.

Aos colegas Nelson Rannieri Tirone e Bethânea Crema Peghini, pela colaboração na extração das biópsias e pelos ensinamentos em biologia molecular.

Ao pós-doutorando Lúcio Roberto Cançado Castellano, pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

À Bibliotecária da UFTM Eliane Rezende pelo auxílio sempre atencioso nas pesquisas bibliográficas.

Às funcionárias da citologia Heloísa Helena Vieira, Nilva Aparecida da Silva Aveiro, Zelma Rocha Camargos Pereira e Dóris Lima Dayrell de Carvalho pela agradável convivência.

À secretaria da disciplina de Ginecologia e Obstetrícia, Andréa Carneiro Bevilaqua Pinheiro, pela atenção e colaboração.

Ao funcionário do Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) Celso Tadeu Barbosa dos Santos, por seu auxílio no laboratório de biologia molecular.

Às secretárias da pós-graduação Nelma Aparecida Ferreira Salgado e Denise Teresinha Cardoso, pela atenção e auxílio logístico.

À professora Ana Maria Bertini Mardegan, pela correção ortográfica deste trabalho.

Aos queridos tios: Ilza de Carvalho, Elza Maria de Carvalho Pena, José Marciano Pena Mundim e Odete Olívia dos Santos, pelo constante apoio durante a minha graduação.

Às pacientes, fundamentais em nosso estudo por tornarem possível a realização deste trabalho, meu respeito e gratidão.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 CÂNCER DO COLO UTERINO.....	19
1.2 PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV)	21
1.2.1 Epidemiologia do HPV.....	23
1.2.2 Mecanismos de evasão imunológica do HPV	26
1.3 CITOCINAS	27
1.4 INTERFERON NO TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS INTRA-EPITELIAL CERVICAL	29
2. HIPÓTESES.....	35
3. OBJETIVOS	37
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	39
4.1 CASUÍSTICA	39
4.2 APLICAÇÃO DO INTERFERON.....	41
4.3 EXTRAÇÃO DE RNA DOS FRAGMENTOS ARMAZENADOS EM TRIZOL® UTILIZANDO O PROTOCOLO DA INVITROGEN™ LIFE TECNOLOGIES.	41
4.3.1 Obtenção do RNA	42
4.3.2 Transcrição Reversa de RNA para DNA complementar (RT-PCR)	42
4.4 PROTOCOLO DE PCR.....	43
4.5 DETECÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS	49
4.6 PESQUISA DO DNA DO HPV POR CAPTURA HÍBRIDA (CH)	50
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
5. RESULTADOS.....	55
5.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CLÍNICA E DA CARGA VIRAL DAS PACIENTES, ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM IFN α -2b.....	56

5.2 PERFIL DA EXPRESSÃO DE CITOQUINAS ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM IFN α -2b INTRALESIONAL	58
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÕES.....	75
8. RESUMO.....	77
9. ABSTRACT.....	81
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

ANEXOS

ANEXO A: Parecer consubstanciado aprovado pelo CEP

ANEXO B: Protocolo do Projeto

ANEXO C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

ANEXO D: Fotos (Blauferon B ^R-Blausiegel, Pipetas, Termociclador, Aparelho para Eletroforese, Kit coletor para realização de Captura Híbrida)

ANEXO E: Imagens colposcópicas das lesões antes e após o tratamento

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema representativo do genoma do HPV. Fonte: BURD, 2003.....	21
Figura 2. Ilustração adaptada mostrando a progressão da neoplasia intra-epitelial cervical para câncer invasivo. Fonte: WOODMAN <i>et al.</i> , 2007.	24
Figura 3. Mecanismos de Ação do IFN.....	30
Figura 4. Perfil dos produtos amplificados por PCR após corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata. As bandas observadas correspondem aos produtos amplificados: IFN- γ (4A), TNF- α (4B), IL-2 (4C), IL-12 (4D), IL-4 (4E), IL-10 (4F), TGF- β 1 (4G), TGF- β 2 (4H), TGF- β 3 (4I) e Beta-actina (4J).....	61
Figura 5. Número de pacientes que responderam ou não ao tratamento com IFN α -2b....	64
Figura 6. Médias \pm DP da carga viral de HPV de alto risco, em amostras colhidas antes e após o tratamento com IFN α -2b, nas pacientes que apresentaram resposta e falha terapêutica.....	64

Lista de Tabelas e Quadros

Quadro 1. Características dos iniciadores sintetizados para a amplificação de fragmentos específicos de c-DNA.....	49
--	----

Tabela 1. Diagnóstico inicial e final por biópsia de todas as pacientes e conduta tomada em cada caso, após o término do tratamento com IFN α -2b.....	57
---	----

Tabela 2. Carga viral do HPV de alto risco, em amostras colhidas antes e após o tratamento com IFN α -2b, nos grupos de pacientes que apresentaram resposta e falha terapêutica.....	57
---	----

Tabela 3. Expressão de citocinas nas pacientes que responderam ou não, antes e após o tratamento com IFN α -2b.	62
---	----

Tabela 4. Expressão de citocinas, antes e após o tratamento com IFN α -2b nas pacientes que responderam ou não ao tratamento.	63
---	----

Lista de Abreviaturas

APCs: Células Apresentadoras de Antígenos

α : alfa

β : beta

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar

$^{\circ}\text{C}$: Grau Celsius

CTLs: Linfócitos T citotóxicos

DEPC: Dietilpirocarbonato

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxinucleotídeo trifosfato

EDTA: ácido etileno diamino tetracético

eIF2: fator 2 de início de tradução eucariótico

et al: colaboradores

f: forward

FoxP3: *Transcription factor Forkhead box P3*

g: Unidade de medida da força centrífuga relativa

GM-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos

γ : gama

HPV: Papilomavírus humano

IFN: interferon

IFNAR1: Receptor de Interferon alfa tipo 1

IFNAR2: Receptor de Interferon alfa tipo 2

IFNAR1: Receptor de Interferon gama tipo 1

IFNAR2: Receptor de Interferon gama tipo 2

IgE: Imunoglobulina E

IL: interleucina

INCA: Instituto Nacional de Câncer

IPON: Instituto de Pesquisa em Oncologia

IRF: Fatores reguladores de IFN

JAK: Janus Kinase

kDa: kilodalton

λ : lambda

MgCl: Cloreto de Magnésio

MHC: Complexo de Histocompatibilidade Principal

ml: mililitro

mRNA- Ácido ribonucleico mensageiro

NIC: Neoplasia intra-epitelial cervical

NIC I: Neoplasia intra-epitelial cervical grau I

NIC II: Neoplasia intra-epitelial cervical grau II

NIC III: Neoplasia intra-epitelial cervical grau III

nm: nanômetro

Pb: par de base

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

p53: Proteína 53

pg: picograma

pH: potencial de hidrogênio iônico

pRB: Proteína Retinoblastoma

r: reverse

RNA: ácido ribonucleico

RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa

TGF- β 1: Fator Transformador de Crescimento beta 1

TGF- β 2: Fator Transformador de Crescimento β eta 2

TGF- β 3: Fator Transformador de Crescimento β eta 3

Th1: linfócitos T auxiliares tipo I

Th2: linfócitos T auxiliares tipo II

Th3: linfócitos T auxiliares tipo III

TNF : Fator de Necrose Tumoral

Treg: Células T reguladoras

TYK: Tirosina Kinase

U: unidade

ul: microlitro

Introdução

1 1. INTRODUÇÃO

2

3 1.1 CÂNCER DO COLO UTERINO

4

5 Com aproximadamente 500 mil casos novos por ano no mundo, o câncer do
6 colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres e o responsável
7 pelo óbito de, aproximadamente 250 mil mulheres por ano, sendo sua incidência duas
8 vezes maior em países menos desenvolvidos (PAAVONEN, 2007). No Brasil, foi esperado
9 para o ano de 2008, 18.680 novos casos de câncer do colo do útero, com um risco estimado
10 de 19 casos para cada 100 mil mulheres (INCA-Estimativa de câncer 2008).

11 O câncer do epitélio pavimentoso cervical desenvolve-se geralmente a partir de
12 uma lesão pré-maligna ou precursora denominada neoplasia intra-epitelial cervical
13 (WOODMAN *et al.*, 2007). Esse termo Neoplasia Intra-Epitelial Cervical (NIC) foi criado
14 por Ralph Richart em 1967 e dividiu as lesões em três graus (NIC I, NIC II, NIC III ou
15 carcinoma *in situ*) de acordo com a severidade da lesão (TRANBALOC, 2008).

16 A classificação de Bethesda em 2001 dividiu as neoplasias intra-epiteliais
17 cervicais em: lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) que inclui displasia leve
18 (NIC I) associada à infecção pelo HPV e lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau
19 (HSIL) que inclui displasia moderada (NIC II) e displasia severa, carcinoma *in situ* (NIC
20 III) (CUSCHIERI & CUBIE, 2005; LAI *et al.*, 2008).

21 A NIC I regrediria na maioria dos casos, enquanto 20-45% das lesões NIC II e
22 NIC III progressariam para o câncer cervical quando não tratadas. Estima-se uma progressão
23 de NIC para câncer cervical geralmente de 10-15 anos (CUZICK *et al.*, 2008).

1 Atualmente está bem definido o papel do papilomavírus humano (HPV) como
2 fator causal para o surgimento do câncer cervical e suas lesões precursoras (PAAVONEN,
3 2007; BEHTASH & MEHRDAD, 2006). Embora na maioria dos casos de NIC III ou
4 câncer cervical contenham HPV de alto risco oncogênico, para que esses causem alguma
5 lesão, vários fatores parecem estar envolvidos, entre eles: relação sexual precoce, múltiplos
6 parceiros sexuais, multiparidade, uso prolongado de contraceptivos orais, tabagismo, baixo
7 nível sócio-econômico, infecção por *Clamidia trachomatis* e deficiência de micronutrientes
8 (SYRJÄNEN, 2008; ASHRAFUNNESSA & KAMAL, 2008; VANAKANKOVIT &
9 TANEEPANICHSKUL, 2008; BOSCH & DE SANJOSÉ, 2007; MUNÖZ *et al.*,
10 2006; MARKOWSKA *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2004; FREGA *et al.*, 2003).

11 O exame citológico do colo do útero ou esfregaço de Papanicolaou foi
12 introduzido como método de detecção do câncer do colo do útero e suas lesões
13 precursoras. A identificação através do microscópio de células malignas ou pré-malignas é
14 uma das estratégias mais bem sucedidas para a prevenção do câncer cervical (NAUCLER
15 *et al.*, 2007).

16 Histologicamente, a NIC I se caracteriza pela presença de atipias celulares
17 leves acometendo apenas 1/3 do epitélio basal; na NIC II observam-se anormalidades
18 nucleares mais acentuadas e mitoses numerosas que se estendem até os 2/3 proximais do
19 epitélio; na NIC III as anormalidades nucleares e as mitoses são intensas e estão presentes
20 em toda a espessura do epitélio. Na colposcopia, a NIC apresenta uma zona de
21 transformação anormal representada por epitélio acetobranco, mosaico, pontilhado,
22 leucoplasia e vasos atípicos (ROKITA, 2006).

23 Várias técnicas são usadas no tratamento das neoplasias intra-epitelial cervical,
24 incluindo conização, crioterapia, vaporização a laser e procedimento eletro-cirúrgico em
25 alça (MATHEVET *et al.*, 2003). Vários estudos mostram sucesso no tratamento clínico

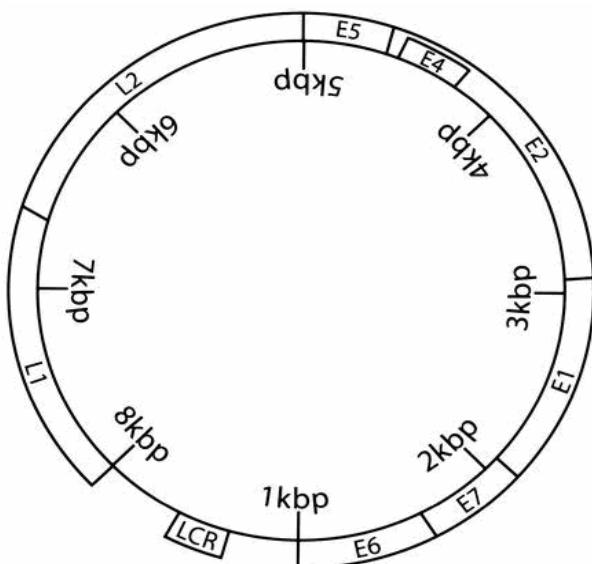
1 utilizando interferon em pacientes com NIC associada à infecção pelo HPV. Entre suas
 2 vantagens está a preservação do colo uterino e do futuro reprodutivo das pacientes
 3 (CHAKALOVA & GANCHEV, 2004; SIKORSKI & ZRUBEK, 2003; KOROMILAS *et*
 4 *al.*, 2001).

5

6 1.2 PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV)

7

8 Os papilomavírus são membros da família *Papovaviridae*, com
 9 aproximadamente 55nm de diâmetro, com capsídeo icosaédrico de 72 capsômeros, sem
 10 envelope, sendo seu genoma composto de DNA circular de dupla fita, com
 11 aproximadamente 8000 pares de bases nitrogenadas e oito regiões conhecidas como ORFs
 12 *Open Reading Frames* (ZHENG & BAKER, 2006; HEBNER & LAIMINS, 2006;
 13 BRENNNA & SYRJÄNEN, 2003).



14 **Figura 1.** Esquema representativo do genoma do HPV. **Fonte:** BURD, 2003.

1 O HPV está dividido em região precoce (*Early*), com proteínas envolvidas na
2 replicação do DNA viral, regulação transcricional e transformação; região tardia (*Late*),
3 que codifica as proteínas dos capsídios virais, e a região longa ou reguladora (*Long*
4 *Control Region* –LCR) responsável pela transcrição e replicação do DNA. A região
5 precoce contém as proteínas E1, E2, E4, E5, E6, E7 e a região tardia as proteínas L1 e L2
6 (PRÉTET *et al.*,2007; BURD,2003).

7 A proteína E4 promove a quebra do citoesqueleto de ceratina. E1 e E2 estão
8 envolvidos na replicação do DNA viral e na regulação da transcrição inicial. E5, E6 e E7
9 são oncogenes virais e sua expressão induz a transformação e a imortalização celular. Em
10 particular E6 e E7 são duas oncoproteínas virais que neutralizam, respectivamente, p53 e
11 pRB, duas proteínas supressoras de tumor celular (NARISAWA-SAITO & KIYONO,
12 2007;GARNETT & DUERKSEN-HUGHES,2006; LONGWORTH & LAIMINS, 2004).

13 A função dos produtos dos genes E6 e E7, durante uma infecção por HPV de
14 alto risco, é modificar o ambiente celular para facilitar a replicação viral (WISE-DRAPER
15 & WELLS, 2008). O gene E6 do HPV se liga a proteína p53 conduzindo a uma rápida
16 degradação através de uma ubiquitina ligase celular e as atividades normais da p53 que
17 governam a parada em G1, apoptose, e reparo de DNA são anuladas. O produto do gene
18 E7 do HPV se liga à forma hipofosforilada da família RB das proteínas interrompendo o
19 complexo entre pRB e o fator de transcrição celular E2F, resultando na liberação de E2F,
20 com transcrição de genes promotores de tumor e de genes envolvidos na progressão do
21 ciclo celular e na síntese de DNA (ARVANITIS & SPANDIDOS, 2008; CALDEIRA *et*
22 *al.*, 2005).

1 **1.2.1 Epidemiologia do HPV**

2

3 A principal via de transmissão do HPV se dá pelo contato sexual com pessoa
4 infectada. Em gestantes, o vírus pode ser transmitido para o feto durante a gestação ou no
5 momento do parto (LJUBOJEVIC *et al.*,2008).

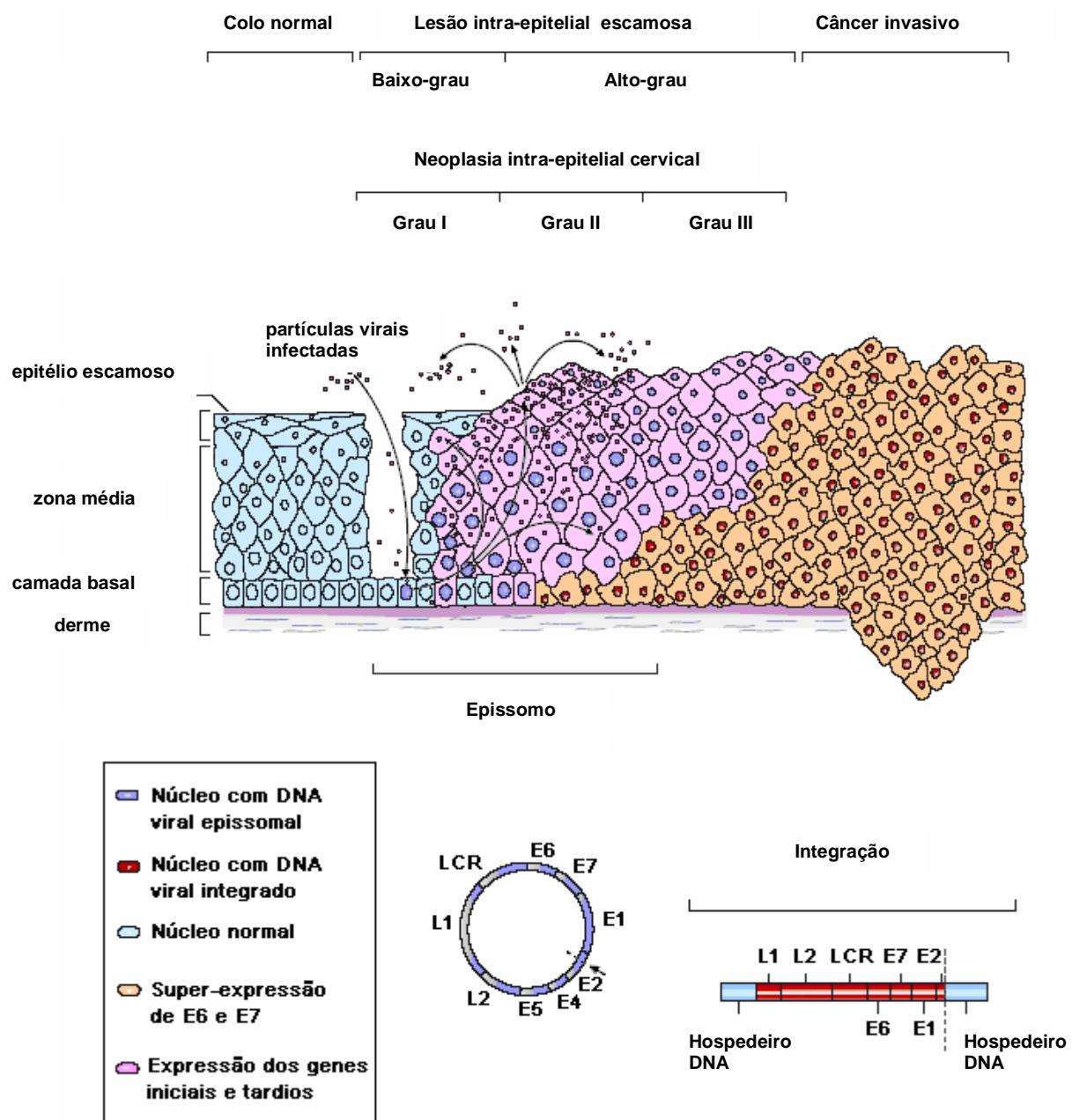
6 Até o momento foram identificados mais de 100 genótipos diferentes desse
7 vírus, dos quais 40 infectam o trato genital inferior, e desses, 15 são identificados como de
8 alto risco ou oncogênico, sendo os principais causadores do câncer cervical e da neoplasia
9 intra-epitelial cervical (CASTELLSAGUÉ, 2008; DOORBAR, 2007; SYRJÄNEN &
10 PURANEN, 2000).

11 O vírus pode desaparecer após o contágio vencido pelas defesas do organismo,
12 ou permanecer latente por longo período de tempo e, em presença de fatores
13 predisponentes ligados ao hospedeiro e/ou ao tipo de HPV, desenvolver fase ativa de
14 expressão (MUÑOZ *et al.*,2003).

15 As infecções clínicas mais comuns ocorrem na região genital e são facilmente
16 transmitidas sendo representadas pelas verrugas ou condilomas acuminados. Já as lesões
17 subclínicas não apresentam sintomatologia, podendo progredir para o câncer do colo do
18 útero caso não sejam identificadas e tratadas precocemente (GROSS *et al.*,2007).

19 Segundo MUNÖZ *et al.* (2006) o HPV se adapta perfeitamente ao tecido
20 hospedeiro em células epiteliais diferenciadas da pele ou mucosa. As partículas virais
21 infectam, em particular, as células metaplásicas cervicais, que lhe são suscetíveis através
22 do contato sexual com parceiro portador da infecção viral em suas formas clínica e
23 subclínica, desencadeando um processo de hiperplasia de células basais. O genoma viral é
24 transportado para o núcleo, onde é traduzido e transcrito. Inicialmente, o DNA viral

- 1 permanece extracromossômico (corpo epissomal), porém, uma vez iniciada a ceratinização
- 2 da área infectada, ocorre a replicação do DNA (HPV) e sua incorporação ao DNA celular.
- 3 A figura a seguir mostra a progressão da neoplasia intra-epitelial cervical para
- 4 câncer invasivo:



- 5 **Figura 2.** Ilustração adaptada mostrando a progressão da neoplasia intra-epitelial cervical para câncer invasivo. **Fonte:** WOODMAN *et al.*, 2007.

1 O HPV acessa as células basais através de micro-abrasões no epitélio cervical.
2 Após a infecção, ocorre a expressão de genes iniciais do HPV, E1, E2, E4, E5, E6 e E7 e
3 replicação do DNA viral a partir do DNA episomal. Nas camadas superiores do epitélio
4 (zona média e zona superficial), o genoma viral é replicado novamente, e os genes tardios
5 L1 e L2, e E4 são expressos. L1 e L2 integram-se aos genomas virais para formar virions
6 de progênie no núcleo. Então, o vírus eliminado inicia uma nova infecção (WOODMAN *et*
7 *al.*,2007).

8 Os genótipos do HPV são classificados como de baixo e alto risco. Esta
9 classificação baseia-se no espectro da lesão por ele induzida. Os tipos de baixo risco
10 induzem apenas verrugas genitais benignas e incluem HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61,
11 70,72 e 81. O grupo de alto risco contém HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58,
12 59, 68, 73 e 82 e estão associados a vários cânceres malignos, entre eles os anogenitais e a
13 99% dos cânceres cervicais (KANODIA *et al.*,2007; GUO *et al.*, 2007; MUNÔZ *et al.*,
14 2003).

15 O 16 e o 18 são os tipos mais carcinogênicos do HPV, sendo responsáveis por
16 70% de câncer cervical e por 50% de neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau. Ao
17 contrário, o HPV 6 e 11 são responsáveis por 90% das verrugas genitais benignas
18 (SHIFFMAN *et al.*,2007). O HPV 18 é o tipo mais fortemente associado ao
19 adenocarcinoma do colo e o HPV 16 é o tipo mais frequentemente detectado quando é
20 diagnosticado o carcinoma de células escamosas (CLIFFORD *et al.*, 2003).

1 **1.2.2 Mecanismos de evasão imunológica do HPV**

2

3 A resposta imunológica de cada indivíduo parece ser o principal determinante
4 para a ocorrência, progressão e recorrência da infecção pelo HPV. No entanto, os
5 mecanismos exatos que disparam uma resposta imune eficiente contra lesões relacionadas
6 ao HPV podem estar relacionados à ativação do sistema imunológico ou à composição
7 genética do hospedeiro (NGUYEN *et al.*, 2005).

8 A infecção pelo HPV apresenta resolução espontânea em 70% a 90% dos
9 casos, sendo eliminada 12 a 24 meses após o diagnóstico inicial (GONÇALVES &
10 DONADI, 2004). No entanto, em indivíduos sem resposta imune efetiva, o câncer cervical
11 pode desenvolver-se (SHEU *et al.*, 2007).

12 O HPV eficientemente evade da resposta imunológica inata e atrasa a ativação
13 da resposta imunológica adaptativa (KOBAYASHI *et al.*, 2004). O próprio ciclo infeccioso
14 do HPV é um mecanismo de evasão imunológica que inibe a detecção do vírus pelo
15 hospedeiro. A replicação e a liberação do HPV não causam morte celular, visto que o
16 queratinócito diferenciado já está programado para morrer, e esta “morte” por causas
17 naturais não representa um sinal de perigo para o sistema imunológico. Para permitir a
18 replicação do vírus, as proteínas virais retardam a condensação nuclear nos queratinócitos
19 infectados formando o coilócito; o queratinócito repleto de vírus morre assim de causas
20 naturais (KUPPER & FUHLBRIGGE, 2004).

21 A infecção pelo HPV não é acompanhada por inflamação e não há nenhum
22 “sinal de perigo” para alertar o sistema imunológico sobre a presença do vírus, resultando
23 em uma infecção crônica e persistente (GIULIANO *et al.*, 2002). As células dendríticas
24 hospedeiras são expostas aos baixos níveis de proteínas virais em um meio não-
25 inflamatório e, como resultado, a ausência de resposta imunológica local pode ser

1 estabelecida na mucosa infectada. Nesse meio tolerante ao antígeno do HPV, as defesas do
2 hospedeiro tornam-se irrevogavelmente comprometidas, e as células efetoras antígeno-
3 específicas do HPV ou não são recrutadas para a área infectada ou sua atividade é infra-
4 regulada (STANLEY, 2006).

5 A maioria dos estudos sugere que a infecção por HPV genital é muito comum
6 em mulheres jovens sexualmente ativas, com prevalência de até 80% em certas populações
7 adolescentes (BROWN *et al.*, 2005). A média de tempo necessário para a remoção de tipos
8 de HPV de alto risco, particularmente o 16, é de 8 a 14 meses, um tempo maior quando
9 comparado aos tipos de HPV de baixo risco que é de 5 a 6 meses. Contudo, se a resposta
10 imunológica não conseguir remover ou controlar a infecção, então será estabelecida uma
11 infecção persistente, com altos níveis de replicação de DNA do HPV de alto risco
12 (STANLEY, 2006). Pessoas persistentemente infectadas apresentam maior probabilidade
13 de evolução para neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau e carcinoma invasivo
14 (STANLEY *et al.*, 2007).

15

16 **1.3 CITOCINAS**

17

18 Citocinas são proteínas solúveis secretadas por células do sistema imune e
19 funcionam como mensageiros para ajudar na regulação de uma resposta imune, auxiliando
20 e regulando outras células. Nas respostas imunes inatas, as citocinas são produzidas
21 principalmente pelos macrófagos e, na imunidade adaptativa, são secretadas pelas células
22 T. As citocinas podem agir na mesma célula que as produziu (ação autócrina) ou nas
23 células vizinhas (ação parácrina). Além disso, as citocinas podem apresentar propriedades
24 pleiotrópicas, quando cada citocina apresenta várias ações biológicas e propriedades

1 redundantes, quando várias citocinas apresentam atividades biológicas iguais ou
2 semelhantes (ABBAS & LITCHMAN, 2007).

3 As células T auxiliares CD4+ podem se diferenciar em subpopulações de
4 células efetoras que produzem grupos distintos de citocinas, como as subpopulações Th1,
5 Th2 e Th3 (ABBAS & LITCHMAN, 2007).

6 As células Th1 secretam IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12 e estimulam respostas
7 mediadas por fagócitos e o extermínio de microorganismos, promovendo imunidade
8 mediada por células. As células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 e
9 estimulam a imunidade independente de fagócitos, mediada por eosinófilos e atuam na
10 produção de anticorpos IgE (LEE *et al.*, 2004; TAYLOR *et al.*, 2000; OHTSUKA &
11 SANDERSON, 2000).

12 Uma terceira categoria de célula T, células T regulatórias (Tregs) com o
13 fenótipo CD4+ CD25+, expressa o fator de transcrição FoxP3 que secreta IL-10 e TGF- β .
14 Essas células podem reconhecer auto-antígenos, regular respostas para antígenos exógenos
15 e provocar infecções virais crônicas e imunopatológicas (ROUSE & SUVAS, 2004).

16 Vários estudos vêm sendo desenvolvidos buscando avaliar a produção de
17 citocinas pelo colo uterino em pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical associada à
18 infecção pelo HPV e buscando avaliar o papel de determinadas citocinas na progressão das
19 NICs (EL-SHERIF *et al.*, 2001; DE GRUIJL *et al.*, 1999; SONG *et al.*, 2007; TAVARES-
20 MURTA *et al.*, 2007).

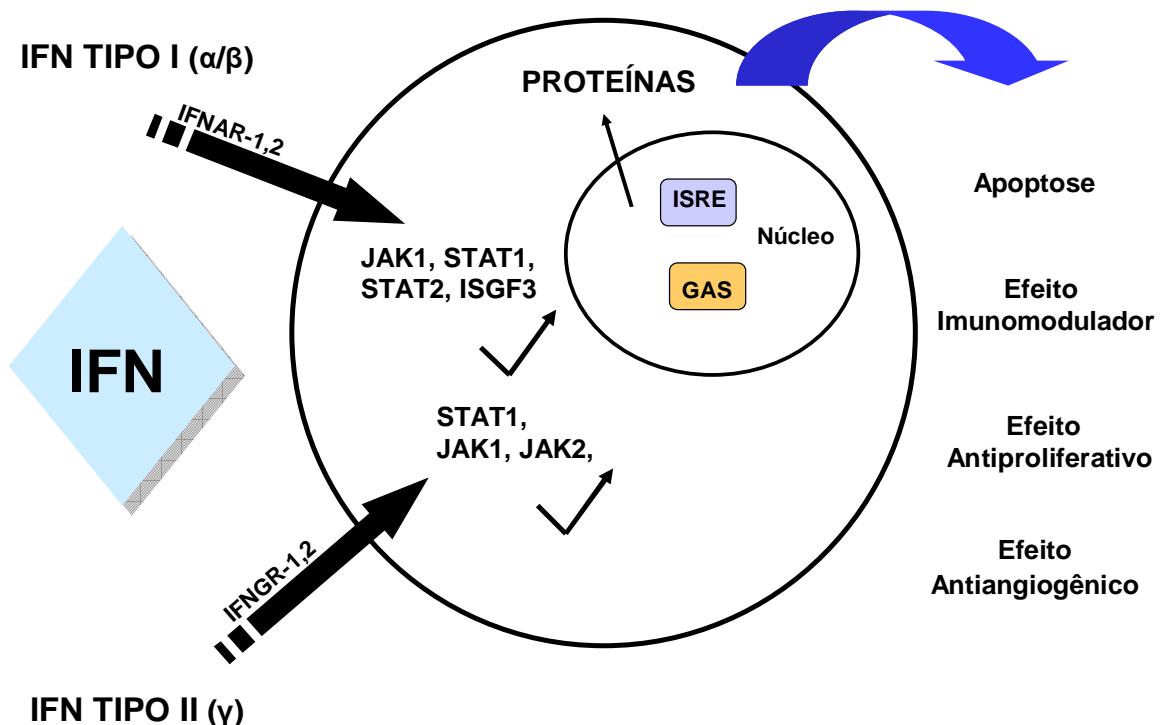
1.4 INTERFERON NO TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS INTRA-EPITELIAL CERVICAL

3

4 Descoberto em 1957, como uma substância secretada por células infectadas por
5 vírus, os interferons (IFNs) constituem a família de citocinas pleiotrópicas com potente
6 atividade antiviral, antiproliferativa, antitumoral e imunomoduladora (MAHER *et al.*,
7 2007). Os IFNs são classificados em três grupos, I, II e III (RANDALL & GOODBOURN,
8 2008).

9 O IFN tipo I está associado à ação antiviral e inclui o IFN- α e IFN- β ; o IFN
10 tipo II incrementa a atividade imunológica e inclui apenas o IFN- γ (BRIDEAU-
11 ANDERSEN *et al.*, 2007; SAMUEL,2001); já o IFN tipo III compreende o IFN- $\lambda 1$,- $\lambda 2$, -
12 $\lambda 3$ e também apresenta ação antiviral (ANK *et al.*, 2006; ONOGUCHI *et al.*, 2007).

13 Todos os IFNs tipo I (α/β) se ligam ao mesmo receptor, que é composto de
14 duas subunidades IFNAR1 e IFNAR2. O IFN tipo II (γ) se liga ao receptor IFN γ R,
15 composto de duas subunidades IFN γ R1 e IFN γ R2 (SCHRODER *et al.*, 2004). Os
16 receptores de IFN tipo I estão associados à enzima tirosina-quinase (TYK) que são
17 fosforiladas em outras tirosina-quinases (Janus-quinases) JAK1 e JAK2, que por sua vez
18 fosforilam Stat 1 e Stat 2 (MURRAY, 2007). Essas Stats (transdutor de sinal e ativador da
19 família de transcrição) recrutadas, formam o complexo denominado fator genético 3
20 estimulador de IFN (ISGF3), que é direcionado ao núcleo e induz a transcrição dos genes
21 portadores do elemento responsável pela estimulação do interferon (ISRE) e da sequência
22 ativadora de IFN- γ (GAS) (SCHINDLER & PLUMLEE, 2008).



1 **Figura 3.** Mecanismos de Ação do IFN

2

3 Os interferons ativam inúmeros genes, inclusive dois com atividade antiviral
 4 direta: a proteína cinase de 67 kDa que inibe a fosforilação de eIF-2 e bloqueia a tradução
 5 de proteínas; a 2',5' oligoadenilato sintetase que ativa uma endonuclease envolvida na
 6 degradação do RNA viral (MALATHI *et al.*, 2005).

7 Um dos papéis mais importantes dos interferons na promoção de respostas
 8 imunológicas protetoras é a capacidade de regulação da expressão das proteínas do
 9 complexo de histocompatibilidade principal (MHC). A maioria dos抗ígenos tumorais que
 10 promovem respostas imunológicas são proteínas citosólicas sintetizadas de maneira
 11 endógena, apresentadas como peptídeos associados ao MHC de classe I. Portanto, esses
 12抗ígenos são reconhecidos por CTLs CD8+ restritos ao MHC da classe I, cuja função é a
 13 lise das células tumorais (YORK & ROCK, 1996).

1 Os interferons podem afetar a proliferação das células cancerígenas ou induzir
2 a diferenciação das células do tumor (NOMELINI *et al.*,2007). Os efeitos antitumorais do
3 IFN resultam de uma ação direta na proliferação ou composição antigênica das células
4 bloqueando parcialmente a translocação celular com uma significativa redução da síntese
5 protéica, particularmente mRNA, com inibição da indução dos fatores de crescimento
6 celular específicos, podendo também ter efeitos indiretos, tais como a imunomodulação e a
7 inibição da angiogênese do tumor (KUFE & WEICHSELBAUM, 2003; PENNA *et*
8 *al.*,1994).

9 O IFN pode induzir a apoptose, ativando a cascata de caspases (MUSCAT *et*
10 *al.*, 2006; SAIDI *et al.*, 2006). A apoptose induzida por IFN- α foi associada à ativação de
11 caspases 1, 2, 3, 8 e 9 (THYRELL *et al.*, 2002). O IFN tipo I tem efeito antitumor por meio
12 do aumento nas células T citotóxicas, células natural Killer e células dendríticas
13 (LINDNER, 2002).

14 O IFN- α já foi usado no tratamento de doenças como a leucemia de células
15 pilosas (LCP) e a leucemia mielóide crônica. Atualmente é utilizado no tratamento de
16 alguns linfomas de células T e B, melanoma maligno metastático, carcinoma celular renal,
17 carcinoma celular basal, sarcoma de Kaposi, papilomatose laríngea, doenças virais como a
18 hepatite C e em enfermidades ginecológicas (MAHER *et al.*,2007;CRISTINA *et al.*,2007).
19 Na maioria das vezes o interferon é co-administrado com outras drogas anticancerígenas na
20 esperança de se obter efeitos aditivos ou sinérgicos sobre o crescimento antitumoral, seja
21 via anti-proliferação ou apoptose, ou via mecanismo mediado pela imunidade (DUNHAM
22 *et al.*,1990).

23 Registros demonstram que o IFN- α é a citocina de uso mais longo da
24 oncologia clínica (FERRANTINI *et al.*,2007) e vários estudos já foram desenvolvidos

1 administrando interferon no tratamento das neoplasias intra-epiteliais cervicais com
2 resultados promissores.

3 Vários trabalhos (CHOO *et al.*, 1986; SLOTMAN *et al.*, 1988; DUNHAM *et*
4 *al.*, 1990; STELLATO, 1992), mostraram bons resultados com o uso do IFN- α no
5 tratamento das NICs.

6 Trabalhos utilizando interferon- β (CINEL *et al.*, 1991; PENNA *et al.*, 1994;
7 ROTOLA *et al.*, 1995; KATESMARK *et al.*, 1999; MICHELETTI *et al.*, 1992;
8 GRISMONDI *et al.*, 1995; CAZORLA *et al.*, 2005) e IFN- γ (IWASAKA *et al.*, 1990;
9 SIKORSKI & ZRUBEK, 2003) também mostraram resultados satisfatórios no tratamento
10 das NICs.

11 No tratamento de uma paciente com carcinoma epidermal invasivo de vagina
12 usando IFN α -2b intralesional MURTA & MURTA (2004) obtiveram completa regressão
13 da lesão vaginal.

14 Interferon- α e ácido retinóico podem ter efeito anti-proliferativo acumulado,
15 melhorando a sensibilidade das células à radioterapia, no tratamento de câncer do colo do
16 útero (BASU *et al.*, 2006). No tratamento do câncer cervical associado à infecção pelo
17 HPV, foi feita outra associação, a qual consiste em IFN- γ e cisplatina, ativando a cascata
18 de caspases e promovendo a apoptose (HOUGARDY *et al.*, 2005).

19 Os métodos excisionais (a conização clássica a frio, por alça diatérmica e à
20 laser) são as técnicas cirúrgicas mais empregadas no tratamento das neoplasias intra-
21 epitelial cervical de alto grau. Essas técnicas permitem descartar neoplasias invasoras,
22 avaliar margens de ressecção e detectar a persistência ou a recidiva da neoplasia intra-
23 epitelial cervical (RAMOS *et al.*, 2008).

24 A literatura mostra como é frequente a infecção pelo HPV em mulheres
25 jovens (SCHEUNGRABER *et al.*, 2009; LAWSON, 2008; VETRANO *et al.*, 2007;

1 FRANCESCHI *et al.*, 2006). Esse fato expressa a necessidade de terapias conservadoras
2 como o interferon, o qual não altera a anatomia do colo e preserva o futuro reprodutivo das
3 pacientes (MURTA & MURTA, 2004; PENNA *et al.*, 1994; IWASAKA *et al.*, 1990). A
4 eficácia do uso do interferon em pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical associada
5 a infecção pelo HPV, já foi descrita em vários estudos (GRISMONDI *et al.*, 1995;
6 STELLATO, 1992; SIKORSKI & ZRUBEK, 2003; CAZORLA *et al.*, 2005) no entanto,
7 em nenhum deles avaliou-se a resposta imunológica no tratamento com IFN. Entender
8 como o sistema imune atua na terapêutica com IFN é o primeiro passo na busca de
9 tratamentos que possam controlar ou combater as NICs.

Hipóteses

1 2. HIPÓTESES

2

3 1- Pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau, com resposta clínica
4 satisfatória ao tratamento com IFN α -2b intralesional, podem expressar citocinas
5 Th1 no estroma cervical.

6

7 2- Pode ocorrer diminuição significativa na carga viral do HPV de alto risco nas
8 pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau, com resposta clínica
9 satisfatória ao tratamento com IFN α -2b intralesional.

Objetivos

1 3. OBJETIVOS

2

3 1- Avaliar a expressão do RNA mensageiro das citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12,
4 IL-4, IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) no estroma do colo uterino de pacientes
5 com NIC de alto grau, antes e após o tratamento com IFN α -2b intralesional.

6

7 2- Avaliar a presença do HPV de alto risco nas pacientes com neoplasia intra-epitelial
8 cervical antes e após o tratamento com IFN α -2b intralesional.

Casuística e Métodos

1 **4. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

2

3 Para atingirmos nossos objetivos, fizemos um estudo prospectivo transversal,
4 que foi realizado no Ambulatório Maria da Glória da Universidade Federal do Triângulo
5 Mineiro, pelas Disciplinas de Ginecologia e Obstetrícia, Imunologia, Patologia Cirúrgica e
6 pelo Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON). Neste estudo incluímos pacientes com
7 neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau. O estudo foi analisado e aprovado pelo
8 Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (Anexo A).
9 Além disso, cada paciente forneceu, por escrito, consentimento livre após esclarecimento
10 (Anexo C).

11

12 **4.1 CASUÍSTICA**

13

14 O grupo de estudo foi composto de 10 pacientes com idade entre 18 e 50 anos
15 com diagnóstico de Neoplasia Intra-epitelial Cervical grau II e III não submetidas a
16 nenhum tratamento prévio. De cada paciente foram obtidas informações sobre idade,
17 hábitos e condições de vida (tabagismo, uso de drogas, número de parceiros), métodos
18 contraceptivos usados, tendo sido orientado o uso de condom durante todo o tratamento. A
19 identificação das pacientes foi feita por números, sendo que a primeira paciente a participar
20 do trabalho recebeu a identificação “1”, a segunda “2”, a terceira “3” e assim por diante.

21 Os critérios para inclusão foram: ausência de sangramento durante o exame;
22 não utilização de antibióticos orais, fungicidas ou cremes vaginais durante os 30 dias
23 anteriores; nenhuma atividade sexual, pelo menos dois dias antes do dia da coleta das
24 amostras; nenhuma história prévia de tratamento para NIC; colposcopia satisfatória; lesão

1 maior que 1 cm² e não utilização de antiinflamatórios ou imunodepressores 15 dias antes
2 do início do tratamento, até o término do mesmo.

3 Os critérios para exclusão foram: pacientes portadoras de doenças
4 imunodepressoras, cardiopatias graves ou com alteração da função hepática ou renal;
5 gestantes; relato de intolerabilidade ao interferon; pacientes cujo uso de antiinflamatórios
6 ou imunodepressores não poderiam ser suspensos durante o tratamento com interferon e
7 ausência de lesão visível à colposcopia ou lesão muito pequena (inferior a 1 cm²).

8 As pacientes selecionadas de acordo com os critérios descritos anteriormente
9 foram encaminhadas pelo ambulatório de Colposcopia da Universidade Federal do
10 Triângulo Mineiro (UFTM) e já tinham biópsia positiva para lesão de alto grau. As
11 pacientes com alterações no exame colposcópico foram submetidas, mediante
12 consentimento livre e esclarecido, a coleta da biópsia do estroma cervical. Antes da
13 primeira e da última aplicação, as pacientes foram submetidas a exame colposcópico e
14 tiveram as imagens fotografadas através de videocolposcópico (Programa “Software”
15 Vídeo Diagnose [®]).

16 Os fragmentos coletados foram imersos em 1,0 ml de TRIZOL [®] (Invitrogen TM,
17 life tecnologies, Carlsbad, Califórnia, USA), para extração do RNA, conforme protocolo
18 do fabricante e armazenado em freezer a -20°C.

1 4.2 APLICAÇÃO DO INTERFERON

2

3 Foi usado neste trabalho o Interferon α -2b humano recombinante 3.000.000 U
4 (Blauferon B^R-Blausiegel). A caixa da medicação é composta de um frasco-ampola com
5 pó liófilo acompanhado de ampola com diluente de 1,0 ml, acondicionada em geladeira à
6 temperatura 4°C. As aplicações foram realizadas utilizando seringa de 1,0 ml e agulha 13 x
7 0,45 três vezes por semana em dias alternados (segundas, quartas e sextas-feiras), por 6
8 semanas consecutivas, perfazendo um total de 18 aplicações, sendo que em cada aplicação
9 era administrada a dose de 3.000.000 U.

10 A exposição do colo uterino foi realizada através da introdução de espéculo
11 vaginal com antisepsia do colo e paredes vaginais com gaze embebida em polividine
12 tópico usando, para isso, pinça de *Cherron*. Procedia-se então à aplicação da medicação.
13 Em lesões múltiplas ou ocupando mais de um quadrante do colo, as aplicações foram feitas
14 alternadamente em cada lesão (no caso de lesões isoladas) ou em cada quadrante (no caso
15 de lesões contínuas).

16

4.3 EXTRAÇÃO DE RNA DOS FRAGMENTOS ARMAZENADOS EM TRIZOL®

UTILIZANDO O PROTOCOLO DA INVITROGEN™ LIFE TECHNOLOGIES.

19

20 As amostras imersas em TRIZOL® foram submetidas à sonicação por
21 aproximadamente 30 minutos por 50 Watts em temperatura ambiente para a decomposição
22 da arquitetura da peça. Após esse processo, foi aspirado todo o TRIZOL® sonicado
23 transferindo-o para um novo tubo plástico estéril, ficando somente a parte da peça que não
24 se decompôs no tubo anterior.

25 Nesse novo tubo foi realizada a separação das fases adicionando 200 μ l de

1 clorofórmio para cada 1,0 ml de TRIZOL® coletado na amostra, com posterior agitação em
2 vórtex por 15 segundos, incubação a temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugação a
3 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação a mistura separou-se numa fase
4 vermelho-fenol-clorofórmio e em outra incolor aquosa onde se encontra o RNA.

5

6 **4.3.1 Obtenção do RNA**

7

8 No tubo com fase aquosa foi adicionado 500 ul de álcool isopropílico e
9 incubado por 10 minutos à temperatura ambiente, seguida pela centrifugação a 12.000 x g
10 por 15 minutos a 4° C. O RNA ficou precipitado no fundo do tubo.

11 A fase aquosa foi desprezada e o RNA lavado. Adicionou-se 1,0 ml de Etanol
12 75%, com posterior homogeneização em vórtex e centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos
13 a 4°C. O sobrenadante foi desprezado deixando secar o RNA do tubo em geladeira por
14 aproximadamente 12 horas.

15

16 **4.3.2 Transcrição Reversa de RNA para DNA complementar (RT-PCR)**

17

18 O RNA extraído das amostras foi submetido à síntese de DNA complementar
19 (c-DNA), que consiste na transformação da fita de RNA para c-DNA, utilizando reagentes
20 da Invitrogen™ conforme protocolo do fabricante.

21 O RNA seco era, então, homogeneizado novamente em 15,0 ul de H₂O tratada
22 com dietilpirocarbonato (DEPC). Posteriormente, foi preparada uma mistura de
23 substâncias (mix) para a transcrição reversa. O volume final do mix foi de 14,5 ul para
24 cada amostra, sendo que essa solução foi composta por:

1 Oligo dt0,5 ul
2 RNA.....10,0 ul
3 Dntp.....1,0 ul
4 H₂O DEPC3,0 ul

5

6 Inicialmente a solução para transcrição reversa contendo o RNA foi
7 desnaturada a 65°C por 5 minutos, seguida de incubação em gelo por 1 minuto. Após esse
8 procedimento, a solução foi adicionada ao tubo 6,0 ul de uma solução contendo a enzima
9 (Superscrip IIIrt® First-Standart System Synthesis for RT-PCR), responsável pela
10 transformação do RNA em c-DNA (transcrição reversa).

11

12 Componentes para a solução mix de Superscrip IIIrt, com volume final de 6,0 ul:

13

14 Tampão Kit 5x4,0 ul
15 DTT 0,1mol1,0 ul
16 Enzima Superscrip IIIrt1,0 ul

17

18 A amostra foi incubada por 5 minutos a 25°C, seguida de nova incubação por
19 60 minutos a 50°C. A reação foi inativada a 70°C por 15 minutos.

20

21 **4.4 PROTOCOLO DE PCR**

22

23 Para as reações de PCR foi utilizado um protocolo para cada citocina, (IFN- γ ,
24 TNF- α , IL-2, IL-12, IL-4, IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3). Para controle da reação foi
25 analisado o gene da Beta-actina. A reação de amplificação do c-DNA foi realizada

1 utilizando *kit* Invitrogen®. O c-DNA obtido foi adicionado a uma solução contendo os
2 componentes abaixo relacionados.

3

4 Componentes utilizados para amplificação do IFN- γ com volume final de 50 ul:

5

6 Tampão 10x 5,0 ul

7 dntp 10mM..... 0,32 ul

8 MgCl2 50mM..... 1,5 ul

9 Taq DNA polimerase 0,2 ul

10 *primer* 1 1,0 ul

11 *primer* 2 1,0 ul

12 CDNA 100ng 1,0 ul

13 H2O DEPC p/50 ul 39,98 ul

14

15 Componentes utilizados para amplificação da TNF- α com volume final de 25 ul:

16

17 Tampão 10x 2,5 ul

18 dntp 10mM 0,15 ul

19 MgCl2 50mM..... 0,75 ul

20 Taq DNA polimerase..... 0,3 ul

21 *primer* 1 1,0 ul

22 *primer* 2 1,0 ul

23 CDNA 100ng 1,0 ul

24 H2O DEPC p/25 ul 18,3 ul

1 Componentes utilizados para amplificação da IL-2 com volume final de 25 ul:

2 Tampão 10x 2,5 ul
3 dntp 10mM..... 0,15 ul
4 MgCl2 50mM..... 0,75 ul
5 Taq DNA polimerase..... 0,3 ul
6 *primer 1* 1,0 ul
7 *primer2* 1,0 ul
8 CDNA 100ng 1,0 ul
9 H2O DEPC p/25 ul..... 18,3 ul

10

11 Componentes utilizados para amplificação da IL-12 com volume final de 25 ul:

12
13 Tampão 10x 2,5 ul
14 dntp 10mM..... 0,15 ul
15 MgCl2 50mM..... 0,75 ul
16 Taq DNA polimerase..... 0,3 ul
17 *primer 1* 1,0 ul
18 *primer 2* 1,0 ul
19 CDNA 100ng 1,0 ul
20 H2O DEPC p/25 ul..... 18,3 ul

21

22 Componentes utilizados para amplificação da IL-4 com volume final de 25 ul:

23
24 Tampão 10x 2,5 ul
25 dntp 10mM..... 0,16 ul

1 MgCl2 50mM..... 0,75 ul

2 Taq DNA polimerase..... 0,5 ul

3 *primer 1* 1,0 ul

4 *primer 2* 1,0 ul

5 CDNA 100ng 1,2 ul

6 H2O DEPC p/25 ul..... 17,89 ul

7

8 Componentes utilizados para amplificação da IL-10 com volume final de 25 ul:

9

10 Tampão 10x 2,5 ul

11 dntp 10mM..... 0,15 ul

12 MgCl2 50mM..... 0,75 ul

13 Taq DNA polimerase..... 0,3 ul

14 *primer 1* 1,0 ul

15 *primer 2* 1,0 ul

16 CDNA 100ng 1,0 ul

17 H2O DEPC p/25 ul..... 18,3 ul

18

19 Componentes utilizados para amplificação do TGF-β1 com volume final de 25 ul:

20

21 Tampão 10x 2,5 ul

22 dntp 10mM..... 0,15 ul

23 MgCl2 50mM..... 0,75 ul

24 Taq DNA polimerase..... 0,5 ul

25 *primer 1* 1,0 ul

1 *primer 2* 1,0 ul

2 CDNA 100ng 2,0 ul

3 H₂O DEPC p/ 25 ul..... 17,1 ul

4

5 Componentes utilizados para amplificação do TGF-β2 com volume final de 25 ul:

6

7 Tampão 10x 2,5 ul

8 dntp 10mM..... 0,15 ul

9 MgCl₂ 50mM..... 0,75 ul

10 Taq DNA polimerase..... 0,5 ul

11 *primer 1* 1,0 ul

12 *primer 2* 1,0 ul

13 CDNA 100ng 2,0 ul

14 H₂O DEPC p/ 25 ul..... 17,1 ul

15

16 Componentes utilizados para amplificação do TGF- β3 com volume final de 25 ul:

17

18 Tampão 10x 2,5 ul

19 dntp 10mM..... 0,15 ul

20 MgCl₂ 50mM..... 0,75 ul

21 Taq DNA polimerase..... 0,5 ul

22 *primer 1* 1,0 ul

23 *primer 2* 1,0 ul

24 CDNA 100ng 2,0 ul

25 H₂O DEPC p/25 ul..... 17,1 ul

1 Componentes utilizados para amplificação da Beta-actina (controle-positivo) com volume
2 final de 25 ul:
3
4 Tampão 10x 2,5 ul
5 dntp 10mM..... 0,16 ul
6 MgCl2 50mM..... 0,75 ul
7 Taq DNA polimerase..... 0,2 ul
8 *primer* 1 1,0 ul
9 *primer* 2 1,0 ul
10 Kcl 48 mm 1,61 ul
11 CDNA 100ng 1,0 ul
12 H2O DEPC p/ 25 ul..... 16,78 ul

13

14 Os tubos com a solução mix foram homogeneizados e colocados no
15 termociclador-eppendorf® com 64 orifícios. O equipamento foi programado da seguinte
16 forma: 40 ciclos de 94 °C por 5 minutos e 40 segundos (desnaturação); 45 segundos
17 (anelamento) sendo a temperatura específica para cada *primer* (Quadro 1), 72 °C por 10
18 minutos e 45 segundos (polimerização). Ao final dos ciclos de amplificação, a reação foi
19 interrompida por resfriamento a 16 °C e os produtos amplificados retirados do
20 termociclador. No Quadro 1 estão descritos a seqüência dos iniciadores, a temperatura de
21 anelamento e o tamanho do produto amplificado final para cada *primer*.

1

Primers	Sequência	Temperatura de Anelamento	Tamanho do Produto Amplificado
IFN-γ	(F):TCT GCA TCG TTT TGG GTT CTC (R):TCA GCT TTT CGA AGT CAT CTC	55	321pb
TNF-α	(F): GAG TGA CAA GCC TGT AGC CCA TGT TGT AGC (R): GCA ATG ATC CCA AAG TAG ACC TGC CCA GAC T	73	444 pb
IL-2	(F): ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT T (R): GTC AGT GTT GAG ATG ATG CTT TGA C	66	457pb
IL-12	(F): AGT GTC AAA AGC AGC AGA GG (R): AAC GCA GAA TGT CAG GGA G	66	363 pb
IL-4	(F):CCT CTG TTC TTC CTG CTA GCA (R): GCC GTT TCA GGA ATC GGA TCA	56	300 pb
IL-10	(F): ACA GCT CAC CAC TGC TCT GT (R): AGT TCA CAT GCG CCT TGA TG	58	327pb
TGF-β1	(F): ACC AAC TAT TGC TTC AGC TC (R): TTA TGC TGG TTG TAC AGG	55	198 pb
TGF- β2	(F): CTG TCC CTG CTG CAC TTT TGT (R): TCT TCC GCC GGT TGG TCT GTT	60.4	227pb
TGF- β3	(F): CCT TTC AGC CCA ATG GAG AT (R): ACA CAG CAG TTC TCC TCC AA	61.2	241pb
Beta-actina	(F): CAC TCT TCC AGC CTT CCT TCC (R): CGG ACT CGT CAT ACT CCT GCT T	64	311pb

2 Quadro 1. Características dos iniciadores sintetizados para a amplificação de fragmentos
3 específicos de c-DNA.
4

5 4.5 DETECÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

6

7 Após as reações de PCR, os produtos amplificados foram submetidos à
8 eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e corados com prata. Foi utilizado um padrão
9 como controle positivo 50 bp DNA ladder da Invitrogen®.

10 Para preparo da amostra a ser aplicada no gel, foi homogeneizado e adicionado
11 10,0 ul de amostra amplificada em 5,0 ul de tampão e adicionado em cada orifício do gel

1 de poliacrilamida a 10%. A corrida eletroforética foi realizada com corrente de 90 volts por
2 aproximadamente 1 hora e 30 minutos.

3 Após a corrida eletroforética, o gel foi colocado em solução fixadora por 15
4 minutos e, a seguir, essa solução foi desprezada e adicionada solução de nitrato de prata
5 por 15 minutos sob agitação mecânica, seguido de uma lavagem em água MILLI-Q e
6 incubação em solução reveladora por aproximadamente 15 minutos, retornando o gel para
7 a solução fixadora. Os géis foram colocados em placas de vidro e fotografados após
8 secagem.

9

10 **4.6 PESQUISA DO DNA DO HPV POR CAPTURA HÍBRIDA (CH)**

11

12 Para a pesquisa do HPV foi realizado técnica de captura híbrida. O
13 procedimento de coleta foi realizado com base no manual de orientação da empresa Digene
14 do Brasil, fornecedora dos *Kits* e equipamento utilizado no teste de captura híbrida. Para
15 coleta foi utilizado *Kit* coletor especial, composto de um tubete com solução conservadora
16 para ácido desoxirribonucléico (DNA) e uma escova. O colo uterino foi exposto através da
17 introdução de um espéculo vaginal, sendo introduzido 1 cm da escova no canal cervical,
18 realizando movimentos de rotação por três vezes no sentido horário, escovando-se a
19 ectocérvix e as paredes vaginais. Após a coleta a escova foi inserida no tubete, dentro de
20 solução tampão; a haste da escova foi quebrada e o tubete fechado. Movimento de agitação
21 do mesmo foi realizado por 30 segundos a fim de promover homogeneização da amostra.
22 Após esse procedimento o material foi congelado a uma temperatura de 70 graus negativos
23 para fins de conservação.

24 O aparelho utilizado é da marca Captura Híbrida ® II System DML 2000,
25 sistema de microplaca com amplificação de sinal por quimioluminescência. As

1 informações e a metodologia abaixo descritas constam no manual de instrução fornecido
2 pela Digene^R do Brasil.

3 Para a detecção do HPV, o *Kit* possui 18 tipos virais agrupados em dois *pools*
4 de sondas. As sondas para os vírus de baixo risco incluem os tipos 6,11,42,43 e 44,
5 representando aproximadamente 70% desse grupo de vírus. Em relação aos vírus de alto
6 risco, o sistema contém as sondas com os tipos 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 e 68,
7 representando aproximadamente 99% desse grupo de vírus. A sensibilidade da microplaca
8 é de 1 pg/ml, equivalente a 0,1 cópia de vírus por célula. A primeira etapa do teste
9 consistiu na realização de digestão e desnaturação que foram feitas ao mesmo tempo no
10 próprio tubo de coleta. Adicionou-se à amostra, nessa etapa, uma solução contendo
11 hidróxido de sódio, que, além de digerir qualquer outra estrutura, desnaturava o DNA,
12 separando as pontes de hidrogênio que unem as bases nitrogenadas para facilitar a
13 hibridização. Na etapa de desnaturação, o DNA foi submetido a altas temperaturas e a pH
14 alcalino, deixando as bases nitrogenadas livres para a hibridização. Para esse procedimento
15 necessitou-se de banho-maria à 65° C durante uma hora. Após a digestão e a desnaturação,
16 75 ul da amostra foram transferidos para os microtubos, a fim de se proceder a
17 hibridização. Nessa etapa, as sondas de RNA foram diluídas em diluente próprio e
18 aliquotadas na quantidade de 25 ul nos microtubos. A hibridização demandou banho-maria
19 à 65° C durante uma hora. Depois de hibridizado, o material foi transferido para uma
20 microplaca com paredes recobertas por anticorpos monoclonais, a fim de eliminar a
21 possibilidade de reação cruzada, “anti-RNA: DNA”, que iriam reagir com os híbridos
22 formados anteriormente. Essa etapa é denominada captura híbrida e se fez com um *rotary-*
23 *shaker* à temperatura de 20-25° C durante uma hora. A partir da captura, quando já se
24 formou um complexo “anti-RNA: DNA-híbrido” passou-se para a fase de detecção. Toda a
25 solução contida na microplaca foi desprezada, e foi adicionado “anti-RNA: DNA”

1 conjugado a fosfatase alcalina que reagiria com o complexo ligado à parede da microplaca.
2 Essa fase teve duração de 30 minutos à temperatura de 20-25° C. Após esse período,
3 novamente desprezou-se o material líquido da microplaca e uma única lavagem do ensaio
4 foi feita. Com ela retirou-se o excesso de fosfatase alcalina que não formou complexo
5 anticorpo-híbrido-anticorpo. O substrato Emerald foi adicionado e degradado pela
6 fosfatase alcalina durante 15 minutos. O grau de degradação do substrato dependeu da
7 quantidade de enzima ligada ao complexo, o que produziu diferentes intensidades de cor,
8 lidas por quimioluminescência, em equipamento apropriado. Todo o teste de captura
9 híbrida contou com controles negativos e positivos, testados em triplicata. O ensaio usou as
10 leituras dos controles para validação e cálculo do *cut off*. A validação do teste e o cálculo
11 do *cut off* foram feitos baseados em alguns critérios:

12

13 a) o coeficiente de variação das leituras entre os *microwells* dos controles negativos
14 ou positivos não deveria ultrapassar 25%;
15 b) a divisão das médias das leituras de RLU (unidade relativa da luz) dos controles
16 positivos pelos negativos deveria ser superior a 2;
17 c) os controles negativos deveriam respeitar o limite máximo de *background* de 250
18 RLU;
19 d) o valor do *cut off* da reação seria expresso pela média dos controles positivos.

20

21 Houve ainda dois outros controles intra-teste. O primeiro quando se fez a
22 adição do reagente de desnaturação. Todas as amostras devem tornar-se de cor roxa, o que
23 dá certeza de que todas elas foram desnaturadas. O segundo, quando da adição das sondas
24 a coloração deve mudar de roxo para amarelo, assegurando que todas as amostras
25 receberam a quantidade ideal de sonda. A leitura foi totalmente automatizada, uma vez que

1 o quimiolumiômetro é comandado por um *software* que analisa os números recebidos de
2 leitura e faz todos os cálculos de validação do ensaio. O relatório final do teste foi feito
3 pelo *software*, não havendo margem de erro nos cálculos. As etapas de digestão e
4 desnaturação foram realizadas uma única vez. O *kit* para detecção do HPV permitiu a
5 realização de 96 testes, sendo 42 testes para vírus de alto grau, 42 testes para vírus de baixo
6 grau, 3 controles negativos e 3 controles positivos para vírus de alto grau e 3 controles
7 negativos e 3 controles positivos para vírus de baixo grau.

8

9 **4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

10

11 Confeccionou-se uma tabela de contingência contendo a frequência de ocorrência
12 das bandas de cada citocina avaliada. Comparou-se a positividade para cada citocina antes
13 e após o tratamento, entre os grupos de pacientes que apresentaram sucesso e falha
14 terapêutica. Usou-se o teste exato de Fischer devido ao "n" amostral e considerou-se o
15 valor de $p < 0,05$ como significativo. Os dados foram digitados e analisados utilizando-se o
16 programa estatístico GraphPad Prism 5 for Windows (GraphPad Software, Inc.).

17 O teste de Wilcoxon foi usado para comparar a carga viral, antes e após o
18 tratamento com IFN α -2b, nos grupos com resposta e falha terapêutica. A significância
19 estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

Resultados

1 5. RESULTADOS

2

3 Participaram deste estudo 10 pacientes. A idade mínima foi de 22 anos e
4 máxima de 50 anos com média de idade de 32,4 anos.

5 Quanto aos hábitos e condições de vida questionados no protocolo inicial
6 (paridade, tabagismo e número de parceiros sexuais) constatou-se que 70% (n=7) eram
7 multíparas, 60% (n=6) eram tabagistas, 50 % (n=5) já tinham tido 3 ou mais parceiros
8 sexuais e a idade média da sexarca foi de 16,6 anos (mínima de 14 e máxima de 18 anos).

9 No diagnóstico inicial 60% (n=6) das pacientes eram NIC II (1,4,5,6,8 e 9) e
10 40% (n=4) eram NIC III (2,3,7 e10). Das pacientes NIC II, 66,6% (n=4) responderam ao
11 tratamento com IFN α -2b e 33,4% (n=2) tiveram falha terapêutica. Das pacientes NIC III,
12 50% (n=2) responderam ao tratamento com IFN α -2b e 50% (n=2) tiveram falha
13 terapêutica.

14 Efeitos colaterais foram observados em todas as pacientes tratadas e consistiam
15 em: mialgia, febre baixa (em torno de 38° C) e astenia, sendo esses sintomas relatados
16 pelas pacientes apenas nos dias da aplicação, iniciando em média 2 horas após a aplicação
17 com duração de até 8 horas, mas em nenhum caso houve a necessidade de suspender o
18 tratamento.

1 **5.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CLÍNICA E DA CARGA VIRAL DAS**
2 **PACIENTES, ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM IFN α -2b.**

3

4 O diagnóstico inicial e final de todas as pacientes tratadas com IFN α -2b, bem
5 como a idade (anos), a resposta clínica ao tratamento e a conduta tomada em cada caso
6 estão presentes na tabela 1. Em nosso estudo, 60% das pacientes apresentaram diminuição
7 da lesão de alto grau após o tratamento com IFN α -2b; falha terapêutica foi observada em
8 40% das pacientes (Figura 5). As pacientes com resposta ao tratamento foram
9 encaminhadas para o seguimento trimestral no ambulatório de colposcopia enquanto das
10 que tiveram falha (n=4), três foram submetidas à conização e uma foi submetida à alça
11 diatérmica. A carga viral de HPV de alto risco de cada paciente está expressa na tabela 2.
12 Nas pacientes com resposta satisfatória houve queda significativa da carga viral do HPV
13 (p= 0,0313, teste de Wilcoxon) após o tratamento com IFN α -2b. No grupo das pacientes
14 com falha terapêutica não houve significância estatística (p= 0,1250, teste de Wilcoxon)
15 (Figura 6).

1 **Tabela 1.** Diagnóstico inicial e final por biópsia de todas as pacientes e conduta tomada
2 em cada caso, após o término do tratamento com IFN α -2b.

Paciente	Idade (anos)	Diagnóstico inicial	Diagnóstico final	Resposta/Falha	Conduta
1	23	NIC II	NIC I	Resposta	Seguimento
2	22	NIC III	NIC I	Resposta	Seguimento
3	36	NIC III	Infecção pelo HPV	Resposta	Seguimento
4	50	NIC II	NIC I	Resposta	Seguimento
5	25	NIC II	NIC III	Falha	Alça diatérmica
6	30	NIC II	Infecção pelo HPV	Resposta	Seguimento
7	38	NIC III	NIC II	Falha	Conização
8	28	NIC II	NIC II	Falha	Conização
9	28	NIC II	Infecção pelo HPV	Resposta	Seguimento
10	44	NIC III	NIC III	Falha	Conização

Critérios clínicos segundo MARDEGAN, 2008.

3 **Tabela 2.** Carga viral do HPV de alto risco, em amostras colhidas antes e após o
4 tratamento com IFN α -2b, nos grupos de pacientes que apresentaram resposta e falha
5 terapêutica.

Pacientes com boa resposta ao tratamento	Antes do tratamento	Após o tratamento	Pacientes com falha terapêutica	Antes do tratamento	Após o tratamento
Paciente 1	156,0	72,0	Paciente 5	110,0	264,0
Paciente 2	38846,0	6302,0	Paciente 7	2181,0	602,0
Paciente 3	40230,0	1378,0	Paciente 8	16682,0	251482,0
Paciente 4	102,0	94,0	Paciente 10	4558,0	14905,0
Paciente 6	62,0	54,0			
Paciente 9	279971,0	887,0			

1 **5.2 PERFIL DA EXPRESSÃO DE CITOQUINAS ANTES E APÓS O**
2 **TRATAMENTO COM IFN α -2b INTRALESIONAL**

3

4 A figura 4 mostra a expressão do RNA mensageiro das citocinas (IFN- γ , TNF-
5 α , IL-2, IL-12, IL-4, IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) e também do gene da beta-actina,
6 pelo estroma do colo uterino, de pacientes com NIC de alto grau, tratadas com IFN α -2b
7 intralesional. As 10 pacientes tratadas foram identificadas por números, e de cada paciente
8 foram colhidas amostras no início do tratamento, antes da 1^o aplicação (identificada pela
9 letra “i” inicial) e no final do tratamento, após a 18^o aplicação (identificada pela letra “f”
10 final), sendo no total 20 amostras (2 amostras de cada paciente).

11 A análise da expressão do IFN- γ mostra a presença do fragmento em 321 pb.
12 Das 20 amostras analisadas apenas a paciente 6, amostra final (6f), apresentou positividade
13 (Figura 4A).

14 A análise da expressão do TNF- α mostra a presença do fragmento em 444 pb.
15 Das 20 amostras analisadas apenas a paciente 1, amostra final (1f), apresentou positividade
16 (Figura 4B).

17 A análise da expressão da IL-2 mostra a presença do fragmento em 457 pb.
18 Das 20 amostras analisadas apenas a paciente 1, amostra final (1f), apresentou positividade
19 (Figura 4C).

20 A análise da expressão da IL-12 mostra a presença do fragmento em 363 pb.
21 Das 20 amostras analisadas apenas a paciente 7, amostra final (7f), apresentou positividade
22 (Figura 4 D).

23 A análise da expressão da IL-4 mostra a presença do fragmento em 300 pb.
24 Das 20 amostras analisadas foi observado positividade na paciente 4, amostra inicial (4i);

1 na paciente 5, amostra final (5f); na paciente 6, amostra inicial (6i); na paciente 8, amostra
2 inicial (8i); e na paciente 10, amostra inicial (10i) (Figura 4E).

3 A análise da expressão da IL-10 mostra ausência do fragmento em 327 pb, das
4 20 amostras analisadas (Figura 4F).

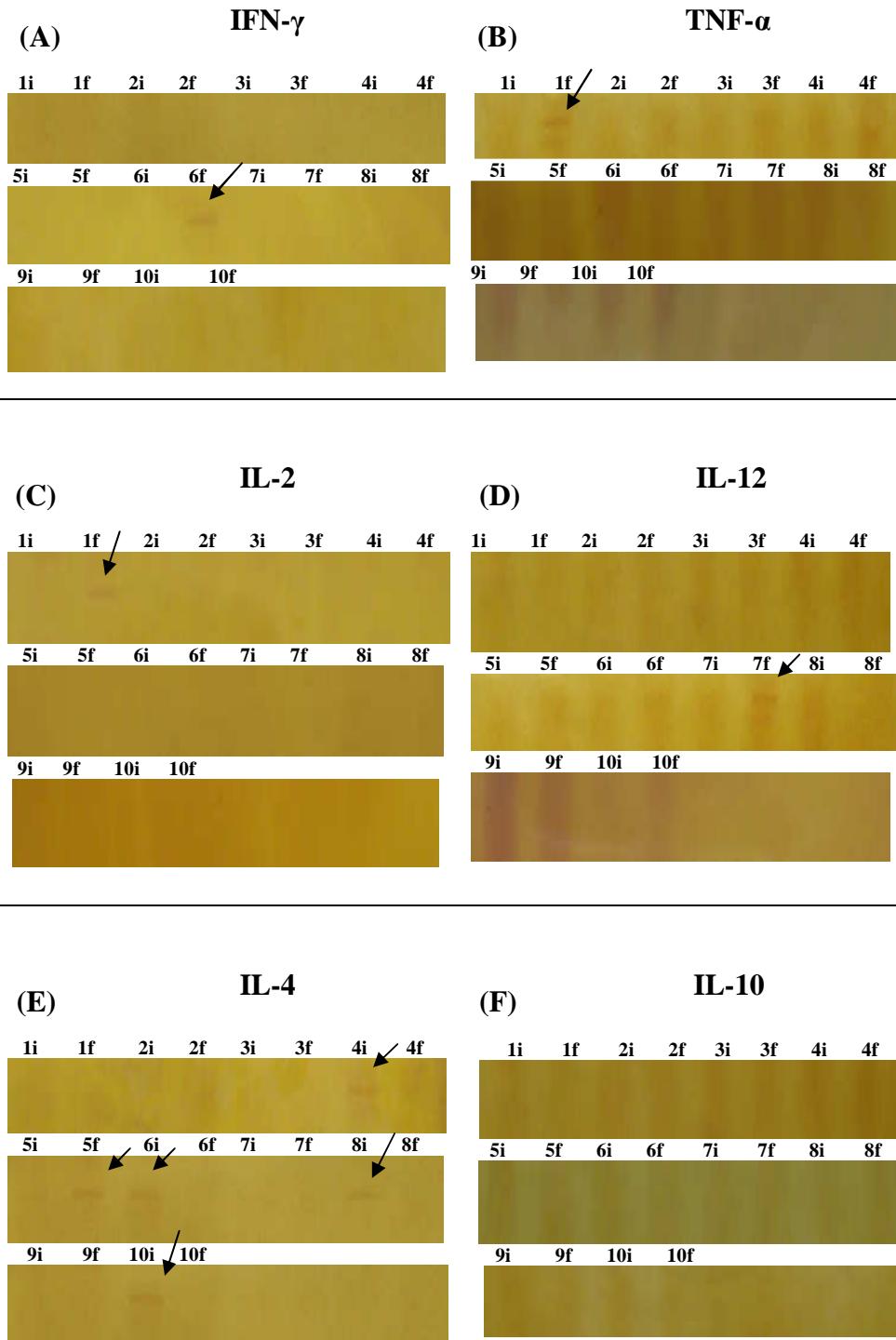
5 A análise da expressão do TGF- β 1 mostra a presença do fragmento em 198 pb.
6 Das 20 amostras analisadas apenas a paciente 4, amostra final (4f), apresentou positividade
7 (Figura 4G).

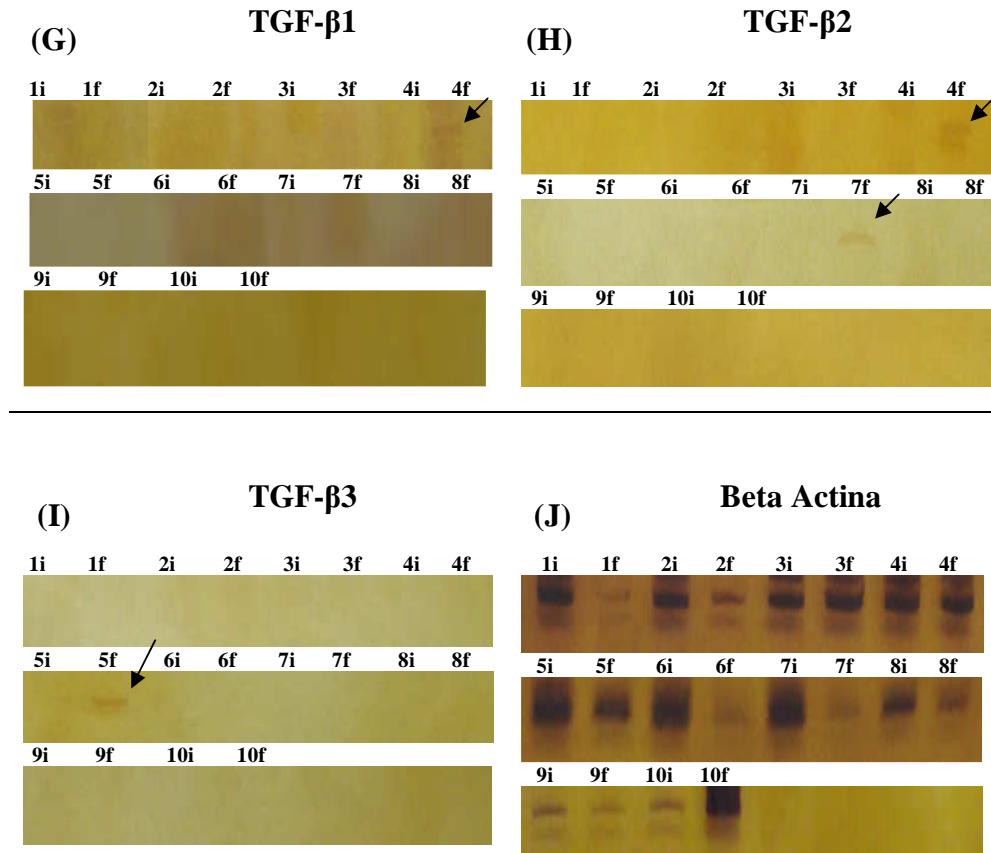
8 A análise da expressão do TGF- β 2 mostra a presença do fragmento em 227 pb.
9 Das 20 amostras analisadas foi observado positividade nas pacientes 4, amostra final (4f), e
10 na paciente 7, amostra f (7f) (Figura 4 H).

11 A análise da expressão do TGF- β 3 mostra a presença do fragmento em 241pb.
12 Das 20 amostras analisadas apenas a paciente 5, amostra final (5f), apresentou positividade
13 (Figura 4 I).

14 A análise da expressão do gene da Beta-actina para controle da reação mostra a
15 presença do fragmento em 311pb estando positiva nas 20 amostras analisadas (Figura 4 J).

16 A análise estatística pelo teste exato de Fischer não mostrou diferença
17 significante na expressão das citocinas no estroma cervical das pacientes com NIC de alto
18 grau, antes e após o tratamento com IFN α -2b intralesional (Tabelas 3 e 4).





1 **Figura 4.** Perfil dos produtos amplificados por PCR após corrida eletroforética em gel de
 2 poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata. As bandas observadas correspondem aos
 3 produtos amplificados: IFN- γ (4A), TNF- α (4B), IL-2 (4C), IL-12 (4D), IL-4 (4E), IL-10
 4 (4F), TGF- β 1 (4G), TGF- β 2 (4H), TGF- β 3 (4I) e Beta-actina (4J).

1 **Tabela 3.** Expressão de citocinas nas pacientes que responderam ou não, antes e depois o
2 tratamento com IFN α -2b.

		Boa Resposta		*p	Falha		*p
		Antes Tto	Após Tto		Antes Tto	Após Tto	
IFN-γ	Pos	0	1	1,000	0	0	n.d.
	Neg	6	5		4	4	
TNF-α	Pos	0	1	1,000	0	0	n.d.
	Neg	6	5		4	4	
IL-2	Pos	0	1	1,000	0	0	n.d.
	Neg	6	5		4	4	
IL-12	Pos	0	0	n.d.	0	1	1,000
	Neg	6	6		4	3	
IL-4	Pos	2	0	0,454	2	1	1,000
	Neg	4	6		2	3	
IL-10	Pos	0	0	n.d.	0	0	n.d.
	Neg	6	6		4	4	
TGF- β1	Pos	0	1	1,000	0	0	n.d.
	Neg	6	5		4	4	
TGF- β2	Pos	0	1	1,000	0	1	1,000
	Neg	6	5		4	3	
TGF- β3	Pos	0	0	n.d.	0	1	1,000
	Neg	6	6		4	3	

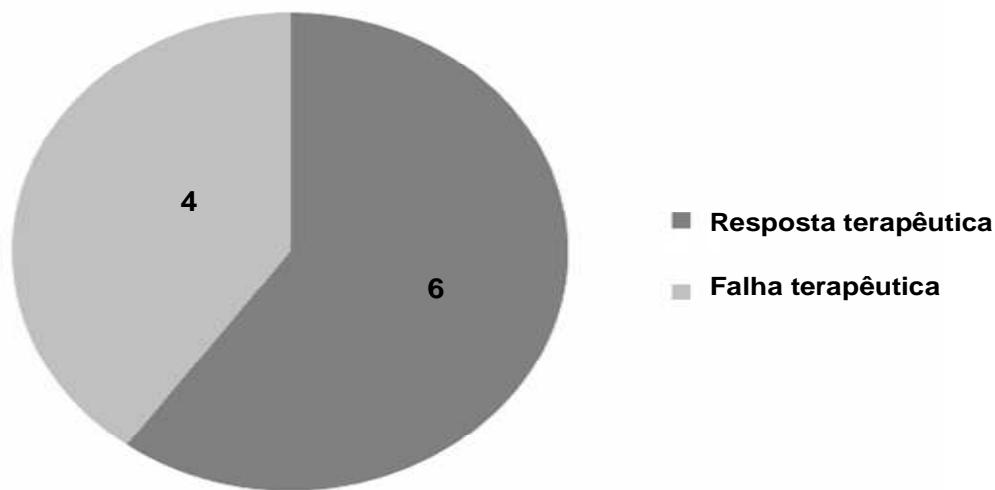
3 *Teste exato de Fisher. **n.d. = não determinado, devido aos valores iguais a zero.

1 **Tabela 4.** Expressão de citocinas, antes e depois do tratamento com IFN α -2b nas pacientes
2 que responderam ou não ao tratamento.

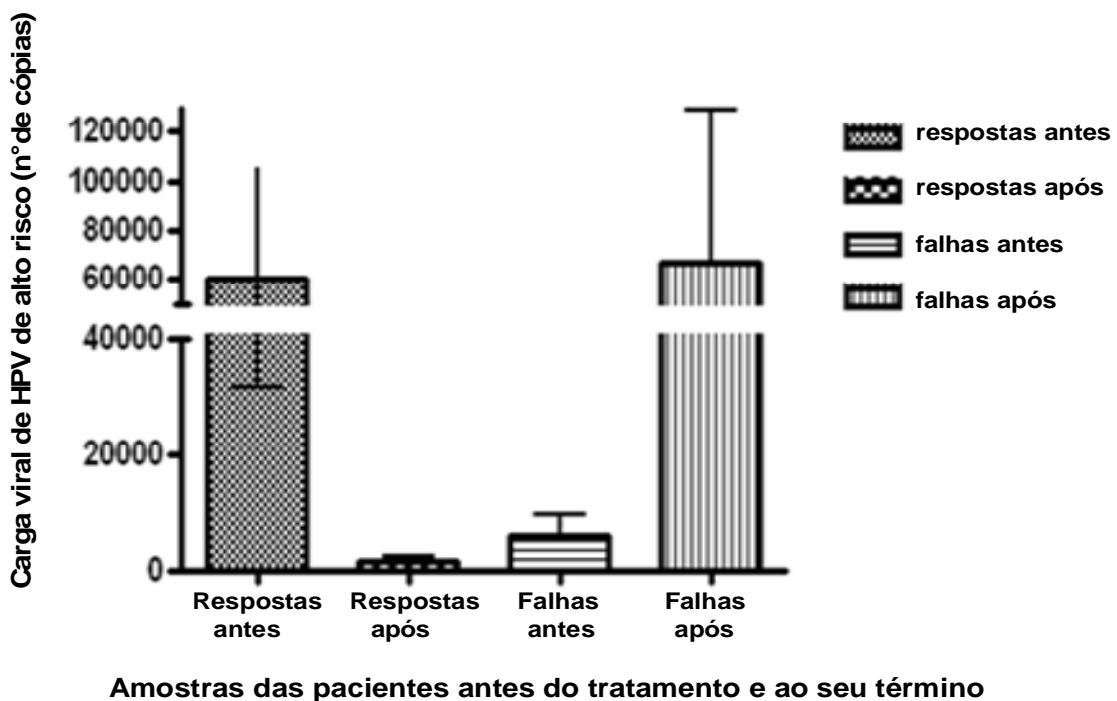
		Antes Tratamento			Após Tratamento		
		Resposta	Falha	*p	Resposta	Falha	*p
IFN-γ	Pos	0	0	**n.d.	1	0	1,000
	Neg	6	4		5	4	
TNF-α	Pos	0	0	n.d.	1	0	1,000
	Neg	6	4		5	4	
IL-2	Pos	0	0	n.d.	1	0	1,000
	Neg	6	4		5	4	
IL-12	Pos	0	0	n.d.	0	1	0,4
	Neg	6	4		6	3	
IL-4	Pos	2	2	1,000	0	1	0,4
	Neg	4	2		6	3	
IL-10	Pos	0	0	n.d.	0	0	n.d.
	Neg	6	4		6	4	
TGF-β1	Pos	0	0	n.d.	1	0	1,000
	Neg	6	4		5	4	
TGF- β2	Pos	0	0	n.d.	1	1	1,000
	Neg	6	4		5	3	
TGF- β3	Pos	0	0	n.d.	0	1	0,4
	Neg	6	4		6	3	

3 *Teste exato de Fisher. **n.d. = não determinado, devido aos valores iguais a zero.

Resposta Clínica



1 **Figura 5.** Número de pacientes que responderam ou não ao tratamento com IFN α -2b.



2 **Figura 6.** Médias \pm DP da carga viral de HPV de alto risco, em amostras colhidas antes e 3 após o tratamento com IFN α -2b, nas pacientes que apresentaram resposta e falha 4 terapêutica.

Discussão

1 6. DISCUSSÃO

2

3 Os benefícios da imunoterapia com interferon já foram descritos em vários
4 trabalhos e entre suas vantagens está a preservação do colo uterino e do futuro reprodutivo
5 de pacientes com NIC de alto grau (MURTA & MURTA, 2004; PENNA *et al.*, 1994;
6 IWASAKA *et al.*, 1990). Em nosso estudo, 60% das pacientes responderam ao tratamento
7 com IFN α -2b, com diminuição da lesão de alto grau. Um fator limitante foi o número de
8 pacientes, no entanto, não impediu a interpretação dos resultados.

9 Vários estudos (SYRJÄNEN, 2008; ASHRAFUNNESSA & KAMAL, 2008;
10 VANAKANKOVIT & TANEEPANICHSKUL, 2008; BOSCH & DE SANJOSÉ, 2007;
11 MUNÖZ *et al.*, 2006; MARKOWSKA *et al.*, 2005; FREGA *et al.*, 2003) mostram que
12 muitos fatores podem aumentar o risco de infecção pelo HPV e o desenvolvimento da NIC,
13 dentre eles pode-se citar a paridade e o tabagismo (SYRJÄNEN *et al.*, 2007; Trottier
14 & Franco, 2006; Castellsaqüé & Muñoz, 2003), a relação sexual precoce e o
15 número de parceiros sexuais (DOMINGO *et al.*, 2008; VETRANO *et al.*, 2007). Em nosso
16 trabalho, todos esses fatores foram observados nas pacientes: 70% (n=7) eram multíparas,
17 60% (n=6) eram tabagistas, 50 % (n=5) já tinham tido 3 ou mais parceiros sexuais e a
18 idade média da sexarca foi de 16,6 anos.

19 Um dado importante observado foi que todas as pacientes que não
20 responderam ao tratamento com IFN α -2b eram fumantes (n=4). O tabagismo é
21 considerado um dos principais fatores associados à persistência da atividade viral,
22 aumentando o risco de progressão ou recidiva das lesões em pacientes com neoplasia intra-
23 epitelial cervical associada à infecção pelo HPV. Dois mecanismos pelos quais o hábito de
24 fumar contribui para a oncogênese cervical incluem exposição direta do DNA de células

1 epiteliais cervicais à nicotina e à cotidina, as quais podem ser encontradas em altas
2 concentrações no muco cervical, induzindo mutação e alteração na atividade gênica.
3 Indiretamente essas substâncias inibem a resposta celular do sistema imunológico,
4 induzindo a replicação viral e a infecção de células adjacentes, aumentando a possibilidade
5 de incorporação do vírus ao genoma celular (RUNOWICZ *et al.*, 1997).

6 Interferons foram descritos pela primeira vez como uma substância capaz de
7 “interferir” no processo de replicação viral, no entanto, vários estudos colocaram em
8 evidência outras ações biológicas dos IFNs, entre elas a ação inibidora do crescimento
9 celular (BORDEN *et al.*, 2007).

10 Vários trabalhos foram realizados utilizando IFN no tratamento das NICs
11 (CHOO *et al.*, 1986; SLOTMAN *et al.*, 1988; DUNHAM *et al.*, 1990; IWASAKA *et al.*,
12 1990; STELLATO, 1992; CINEL *et al.*, 1991; MICHELETTI *et al.*, 1992; PENNA *et al.*,
13 1994; ROTOLA *et al.*, 1995; GRISMONDI *et al.*, 1995; KATESMARK *et al.*, 1999;
14 SIKORKI & ZRUDE, 2003; MURTA & MURTA, 2004; CAZORLA *et al.*, 2005).

15 Utilizando IFN α -2b, em pacientes com NIC, STELLATO (1992) obteve
16 resposta completa em 33% dos casos, regressão parcial em 58% e falha terapêutica em 8%.
17 MURTA & MURTA (2004) também obtiveram resultados satisfatórios utilizando IFN α -
18 2b no tratamento de paciente com carcinoma epidermal invasivo de vagina, com regressão
19 total da lesão.

20 Administrando IFN- β intralesional em pacientes com NIC, MICHELETTI *et*
21 *al.* (1992) observaram remissão completa da lesão em 60% das pacientes. PENNA *et*
22 *al.* (1994) avaliaram a eficácia da terapia com IFN- β intralesional em 41 pacientes com NIC
23 e obtiveram cura em 33 (80%) das pacientes. CINEL *et al.*, (1991) usando gel de interferon
24 β tópico em pacientes com NICs, obtiveram regressão da lesão em 85,36% (NIC I),
25 84,20% (NIC II) e em 37, 5% (NIC III).

1 A administração de IFN- γ também obteve resultados satisfatórios no
2 tratamento de 8 pacientes com NIC, com resposta completa em 5 pacientes (62,5%) e
3 resposta parcial em 1 paciente (12,5%) (IWASAKA *et al.*, 1990). Em outro trabalho
4 utilizando IFN- γ , SIKORSKI & ZRUBEK (2003) trataram 13 pacientes com diagnóstico
5 de NIC I e NIC II, obtiveram resposta completa em 9 casos e em 4 casos foi observado
6 resposta parcial, no entanto, o resultado a longo prazo foi inferior ao tratamento cirúrgico.

7 Observamos em nosso grupo de estudo (n=10) que 60% das pacientes
8 apresentaram boa resposta ao tratamento com regressão da lesão de alto grau, enquanto
9 40% das pacientes tiveram falha terapêutica.

10 Febre, cefaléia, mialgia e astenia foram efeitos colaterais observados em 100%
11 das pacientes durante o tratamento com Blauferon B^R Blausiegel, sendo esses efeitos
12 abordados em outros trabalhos (MAHER *et al.*, 2007; STELLATO, 1992). Efeitos
13 colaterais como diarréia, náusea, erupção cutânea, eritema, mielodepressão, cardiopatia e
14 alteração no sistema nervoso central não foram observados em nenhum caso.

15 Trabalhos avaliando a expressão de citocinas no estroma cervical de pacientes
16 com neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau, tratadas com IFN α -2b intralesional, não
17 existem na literatura.

18 Através do método de RT-PCR, vários trabalhos analisaram a expressão de
19 citocinas Th1, Th2 e Th3 no estroma cervical de pacientes com NIC (EL-SHERIF *et al.*,
20 2001; DE GRUIJL *et al.*, 1999; PARDO-GOVEA *et al.*, 2005; BAIS *et al.*, 2005; SONG *et*
21 *al.*, 2007; SCOTT *et al.*, 2009).

22 Em um trabalho recente SONG *et al.* (2008) observaram regressão do HPV de
23 alto-risco em pacientes com displasia leve ou moderada que expressavam IFN- γ . A
24 infecção pelo HPV leva a imunidade de células T contra a proteína E6 expressa durante a
25 infecção. As células T produtoras de IFN- γ circulantes no sangue periférico são

1 importantes contra a persistência da infecção pelo HPV associado ao desenvolvimento de
2 malignidades. Estudos observaram que defeitos na produção de IFN- γ pode estar associado
3 à persistência da infecção pelo HPV e ao desenvolvimento de neoplasias (SCOTT *et al.*,
4 2001; SONG *et al.*,2007).

5 TNF- α apresenta um papel importante nas reações inflamatórias e pode estar
6 envolvido na regulação do crescimento e na diferenciação dos queratinócitos infectados
7 pelo HPV, inibindo a expressão dos genes E6 e E7 (AGGARWAL, 2003; MAJEWSKI *et*
8 *al.*,1991; SCOTT *et al.*, 2001). A expressão do TNF- α pode favorecer o recrutamento de
9 células natural killer, promovendo mecanismos de eliminação de células tumorais (GLAS
10 *et al.*,2000). No entanto GAIOTTI *et al.* (2000) relataram que o TNF- α promove a
11 progressão do ciclo celular pelo aumento da expressão do RNA mensageiro do HPV-16
12 E6/E7 e consequente imortalização dos queratinócitos infectados pelo HPV.

13 A ausência do RNA mensageiro da IL-2 em lesões por HPV pode explicar a
14 fraca resposta de linfócitos TCD8+ de memória nas pacientes com NIC e carcinoma
15 cervical (RESSING *et al.*,1996). Ainda a demonstração de que linfócitos circulantes
16 produzem IL-2 específica contra antígenos do HPV sugere que a ausência da expressão de
17 IL-2 no colo uterino seja um fenômeno local (TSUKUI *et al.*,1996).

18 A associação entre a expressão do RNA mensageiro da IL-12 *in situ* e a
19 regressão das lesões de NIC grau III, sugere que a resposta imune Th1 mediada pela IL-12
20 esteja relacionada à cura da infecção pelo HPV (DE GRUIJL *et al.*,1999).

21 Sabe-se que a expressão de IL-12 pode ser induzida pelo HPV *in vitro*
22 (MÜLLER *et al.*,1994), porém a sua produção por células dendríticas depende de outros
23 fatores como GM-CSF, TNF- α e IL-1 β que, por sua vez, encontram-se diminuídos no
24 carcinoma cervical (WOODWORTH & SIMPSON, 1993). A diminuição da atividade de
25 células dendríticas devido a baixa produção de TNF e IL-1 pode ser responsável pela

1 reduzida expressão do RNA mensageiro da IL-12 em pacientes com carcinoma cervical
2 associado a infecção pelo HPV (PETERS *et al.*, 1996).

3 PARDO-GOVEA *et al.*(2005) concluíram que a resposta imune tipo Th1 é
4 predominante nas lesões pré-malignas associadas ou não à infecção pelo HPV e estudos
5 observaram decréscimo dessas citocinas em relação ao aumento do grau da NIC (BAIS *et*
6 *al.*,2007; EL- SHERIF *et al.*,2001).

7 Em nosso trabalho, observamos ausência da expressão das citocinas Th1 (IFN-
8 γ , TNF- α , IL-2 e IL-12) antes do tratamento com IFN α -2b nas pacientes que responderam
9 e também nas que falharam ao tratamento. No entanto, após o tratamento com IFN α -2b,
10 observamos que pacientes que responderam ao tratamento expressaram IFN- γ (6f) e IL-2/
11 TNF- α (1f). Esses resultados sugerem que essas citocinas podem ter bloqueado o
12 crescimento dos queratinócitos infectados pelo HPV, inibindo a expressão das
13 oncoproteínas virais, o que promoveu a regressão das lesões de alto grau.

14 Citocinas produzidas pelas células Th2 podem inibir a ativação de macrófagos,
15 de linfócitos T citotóxicos e suprimir a imunidade mediada pelas células Th1 (ABBAS &
16 LITCHMAN, 2007; PARDO-GOVEA *et al.*,2005). A IL-10 inibe funções de macrófagos
17 ativados e a IL-4 pode antagonizar os efeitos ativadores de IFN- γ sobre os macrófagos,
18 inibindo reações imunes mediadas por células (ABBAS & LITCHMAN, 2007).

19 Sabe-se que o aumento da produção de IL-4 e IL-10 pode ser um mecanismo
20 usado pelas células tumorais para escapar do reconhecimento imune (CLERICI *et al.*,
21 1997) estando esse aumento associado à persistência e à progressão das lesões pré-
22 malignas (EL-SHERIF *et al.*, 2001; BAIS *et al.*, 2005). No entanto, resultados contrários
23 tem sido relatados (FARZANEH *et al.*, 2006; WU & KURMAN,1997).

24 Segundo DONALISIO *et al.* (2008), a IL-4 apresenta papel importante na
25 eliminação viral e no controle da infecção pelo HPV, podendo inibir a transcrição do HPV

1 16, sendo importante no controle das infecções por HPV e também no controle do
2 desenvolvimento dos carcinomas associados com HPV (LEMBO *et al.*, 2006).

3 A diminuição da expressão da IL-10 e o aumento da expressão de FoxP3, foi
4 observado em pacientes com NIC II e NIC III (SCOTT *et al.*, 2009). O polimorfismo da
5 IL-10 na posição-1082 está associada à eliminação da infecção pelo HPV (FARZANEH *et*
6 *al*, 2006).

7 Em nosso trabalho, observamos ausência da expressão da IL-10 (Th2) em todas
8 as pacientes, antes e após o tratamento com IFN α -2b. A IL-4 (Th2) estava expressa antes
9 do tratamento com IFN α -2b em 2 pacientes que responderam ao tratamento (4i e 6i) e
10 também em 2 pacientes que falharam ao tratamento (8i a 10i).

11 A expressão da IL-4, antes do tratamento com IFN α -2b, em pacientes com
12 falha terapêutica, sugere que o padrão de resposta imune Th2 pode ter contribuído para a
13 persistência da lesão de alto grau e para a evasão do HPV à vigilância imunológica. Além
14 disso, a expressão concomitante da IL-4 e TGF- β 3 em paciente com falha terapêutica (5f)
15 após o tratamento com IFN α -2b, sugere que a resposta imune Th3 pode ter modulado a
16 resposta imune Th2, impedindo uma resposta clínica satisfatória.

17 Os mecanismos pelos quais as células T reguladoras inibem a resposta imune
18 *in vivo*, ainda é discutido. Algumas células reguladoras produzem citocinas, como o TGF- β
19 e a IL-10, que bloqueiam a ativação dos linfócitos e macrófagos e também podem suprimir
20 outros linfócitos ou APCs, por mecanismos indefinidos que não envolvem citocinas
21 (ABBAS & LITCHMAN, 2007).

22 O TGF- β inibe a proliferação celular epitelial e a transcrição dos genes E6/E7
23 do HPV. Além disso, os níveis de RNA mensageiro do TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3
24 estavam diminuídos em amostras de NIC positivas para HPV 16, em relação as amostras
25 do colo normal (EL-SHERIF *et al.*, 2000). Outro estudo mostrou que a expressão de TGF-

1 β 1 e TGF- β 2 nas biópsias de NIC não estão claramente associados ao grau da lesão e ao
2 curso clínico da infecção pelo HPV (TERVAHAUTA *et al.*,1994). No entanto, em outro
3 trabalho foi observada expressão do RNA mensageiro do TGF- β 1 e de seu receptor
4 TGF β R1 no colo uterino que apresentou transformação maligna em pacientes com NIC
5 (SOUFLA *et al.*,2005).

6 Em nosso estudo não foi possível correlacionar a expressão do RNA
7 mensageiro do TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 com a resposta clínica ao tratamento com IFN
8 α -2b, uma vez que 1 paciente com resposta satisfatória (4f) apresentou expressão
9 concomitante do TGF- β 1 e TGF- β 2 após o tratamento com IFN α -2b, enquanto outras duas
10 pacientes que não responderam ao tratamento (5f e 7f) expressaram TGF- β 2 e TGF- β 3,
11 após o tratamento com IFN α -2b. As citocinas Th3 expressas após o tratamento com IFN
12 α -2b em uma paciente que respondeu ao tratamento, sugere inibição da proliferação de
13 células do epitélio transformadas o que resultou em uma resposta clínica satisfatória.

14 Observamos também que pacientes com falha terapêutica (5f e 7f) tiveram
15 expressão concomitante de IL-12/TGF- β 2 (7f) e IL-4/TGF- β 3 (5f), sugerindo que a
16 resposta imune Th3 pode ter modulado a resposta imune Th1 e Th2 durante o tratamento
17 com IFN e por isso houve falha terapêutica.

18 Nessa discussão podemos observar que resultados controversos são
19 encontrados em trabalhos que analisam a presença de citocinas Th1, Th2 e Th3 em lesões
20 pré-malignas do colo uterino.

21 Neste estudo, observou-se que citocinas Th3 podem modular a resposta imune
22 Th1 e Th2, após o tratamento com IFN α -2b, resultando em falha terapêutica. No entanto, a
23 expressão de citocinas Th1 em pacientes com resposta satisfatória após o tratamento com
24 IFN α -2b, sugere que esse padrão de resposta imune esteja relacionado à regressão da lesão
25 de alto grau.

1 Estudos mostram que a carga viral do HPV aumenta com a progressão do grau
2 da NIC (XI *et al.*, 2008; WOODMAN *et al.*, 2007; FONTAINE *et al.*, 2005). Em nosso
3 trabalho avaliou-se a carga viral do HPV em todas as pacientes, antes e após o tratamento
4 com interferon α -2b intralesional. Os resultados mostram queda significativa da carga viral
5 nas pacientes que responderam ao tratamento ($p=0,0313$). Esses dados sugerem que o
6 tratamento com IFN α -2b intralesional, pode diminuir a carga viral do HPV em pacientes
7 com neoplasia intra-epitelial cervical, favorecendo a regressão das lesões de alto grau.

8 A ampliação do número de pacientes é fundamental para uma melhor
9 compreensão do padrão de resposta imune no tratamento com IFN α -2b e pode contribuir
10 para que novas estratégias terapêuticas sejam traçadas, buscando sempre resultados
11 satisfatórios no tratamento de lesões pré-malignas cervical.

Conclusões

1 7. CONCLUSÕES

2

3 1- O tratamento com IFN α -2b intralesional nas pacientes com NIC de alto grau,
4 obteve resposta clínica satisfatória em 60% das pacientes.

5

2- A resposta imune Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-2) parece estar relacionada à diminuição
do grau da NIC, após o tratamento com IFN α -2b nas pacientes com boa resposta.

8

9 3- A expressão de TGF- β , após o tratamento com IFN α -2b, nas pacientes com falha
10 terapêutica, sugere um papel imunomodulador desta citocina inibindo a resposta
11 protetora Th1.

12

13 4- Houve diminuição significativa na carga viral do HPV de alto risco nas pacientes
14 que responderam ao tratamento com IFN α -2b.

Resumo

1 8. RESUMO

2

3 **Introdução:** O câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais
4 comum entre as mulheres, responsável pelo óbito de, aproximadamente 250 mil mulheres
5 por ano sendo sua incidência duas vezes maior em países menos desenvolvidos.
6 Atualmente está bem definido o papel do HPV como fator causal para o surgimento do
7 câncer cervical e suas lesões precursoras, sendo os métodos excisionais bastante utilizados
8 no tratamento dessas lesões. A infecção pelo HPV está se tornando cada vez mais
9 frequente em pacientes jovens. Esse fato expressa a necessidade de terapias conservadoras
10 como o interferon, que não altera a anatomia do colo e preserva o futuro reprodutivo das
11 pacientes.

12 **Objetivos:** Avaliar a expressão do RNA mensageiro das citocinas (IFN- γ ,
13 TNF- α , IL-2, IL-12, IL-4, IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) no estroma do colo uterino
14 de pacientes com NIC de alto grau, antes e após o tratamento com IFN α -2b intralesional e
15 avaliar a presença de HPV de alto risco nas pacientes com resposta satisfatória e com falha
16 terapêutica, antes e após o tratamento.

17 **Casuística e Métodos:** O grupo de estudo foi composto por 10 pacientes com
18 idade entre 18 e 50 anos com diagnóstico de neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau
19 não submetidas a tratamento prévio. Neste trabalho foi utilizado o interferon α -2b humano
20 recombinante 3.000.000 U (Blauferon B^R-Blausiegel) intralesional. As aplicações foram
21 realizadas utilizando seringa de 1,0 ml e agulha 13 x 0,45 três vezes por semana em dias
22 alternados (segundas, quartas e sextas-feiras), por 6 semanas consecutivas, perfazendo um
23 total de 18 aplicações. A coleta da biópsia foi realizada antes da 1^o aplicação e após a 18^o
24 aplicação do IFN α -2b. Para análise da expressão do RNAm das citocinas foi realizada a

1 técnica de PCR, utilizando-se iniciadores específicos para cada sequência das citocinas
2 estudadas. Após as reações de PCR, os produtos amplificados foram submetidos a
3 eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e corados com prata. A avaliação da carga
4 viral do HPV foi feita por Captura Híbrida.

5 **Resultados:** No diagnóstico inicial, 60% (n=6) das pacientes eram NIC II e
6 40% (n=4) das pacientes eram NIC III. Quanto à resposta ao tratamento: 60% (n= 6)
7 tiveram resposta enquanto que 40% (n= 4) tiveram falha terapêutica. Quanto aos hábitos e
8 condições de vida questionados no protocolo inicial (paridade, tabagismo e número de
9 parceiros sexuais) constatou-se que 70% (n=7) eram multíparas, 60% (n=6) eram
10 tabagistas, 50 % (n=5) tinham tido 3 ou mais parceiros sexuais e a idade média da sexarca
11 foi de 16,6 anos (mínima de 14 e máxima de 18 anos). Quanto a expressão de citocinas
12 antes e após o tratamento com IFN α -2b, observamos: ausência da expressão das citocinas
13 Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12), antes do tratamento com IFN α -2b nas pacientes que
14 responderam e também nas que falharam ao tratamento. No entanto, após o tratamento
15 com IFN α -2b, observamos que pacientes com resposta satisfatória expressaram IFN- γ , IL-
16 2, TNF- α sugerindo um potencial Th1 relacionado à cura. A expressão da IL-10 (Th2)
17 estava ausente em todas as pacientes, antes e após o tratamento com IFN α -2b. A IL-4
18 (Th2) estava expressa antes do tratamento com IFN α -2b, em 2 pacientes que responderam
19 e também em 2 pacientes que falharam ao tratamento. A expressão da IL-4, antes do
20 tratamento com IFN α -2b, em pacientes com falha terapêutica, sugere que o padrão de
21 resposta imune Th2 pode ter contribuído para a persistência da lesão de alto grau. Ainda, a
22 expressão concomitante da IL-4 e TGF- β 3 em paciente com falha terapêutica após o
23 tratamento com IFN α -2b, sugere que a resposta imune Th3 pode ter modulado a resposta
24 imune Th2, impedindo uma resposta satisfatória ao tratamento. Quanto à expressão do
25 RNA mensageiro das citocinas TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, não foi possível correlacionar

1 os resultados com a resposta clínica ao tratamento com IFN α -2b, uma vez que 1 paciente
2 com resposta satisfatória apresentou expressão concomitante do TGF- β 1 e TGF- β 2 após o
3 tratamento com IFN α -2b, enquanto outras duas pacientes que não responderam ao
4 tratamento expressaram TGF- β 2 e TGF- β 3, após o tratamento com IFN α -2b. Observamos
5 também, que essas pacientes com falha terapêutica tiveram expressão concomitante de IL-
6 12/TGF- β 2 e IL-4/TGF- β 3, sugerindo que a resposta imune Th3 pode ter modulado a
7 resposta imune Th1 e Th2 durante o tratamento com IFN e por isso houve falha
8 terapêutica. Resultados controversos são encontrados em trabalhos que analisam a
9 presença de citocinas Th1, Th2 e Th3 em lesões pré-malignas do colo uterino. Queda
10 significativa da carga viral do HPV de alto risco foi observado nas pacientes com resposta
11 terapêutica satisfatória ($p=0,0313$, teste de Wilcoxon), após o tratamento com IFN α -2b.

12 **Conclusões:** O tratamento com IFN α -2b intralesional nas pacientes com NIC
13 de alto grau, obteve resposta clínica satisfatória em 60% das pacientes. A resposta imune
14 Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-2) parece estar relacionada com a diminuição do grau da NIC, após
15 o tratamento com IFN α -2b nas pacientes com boa resposta. A expressão de TGF- β , após
16 o tratamento com IFN α -2b nas pacientes com falha terapêutica, sugere um papel
17 imunomodulador desta citocina inibindo a resposta protetora Th1. Houve diminuição
18 significativa na carga viral do HPV de alto risco nas pacientes que responderam ao
19 tratamento com IFN α -2b.

Abstract

1 9. ABSTRACT

2

3 **Introduction:** Uterine cervix cancer is the second most common type of
4 cancer among women, being responsible for the death of, approximately 250 thousand
5 women a year, and its incidence twice higher in less developed countries. Nowadays, HPV
6 role is very well defined as a causative factor for the appearance of cervical cancer and its
7 precursor lesions, being the excised methods used a lot in the treatment of these lesions.
8 HPV infection is becoming more and more frequent in young patients. This fact expresses
9 the need for conservative therapies such as interferon, which does not alter the anatomy of
10 the cervix and preserves the reproductive future of the patients.

11 **Objectives:** Evaluate the expression of messenger RNA of the cytokines (IFN-
12 γ , TNF- α , IL-2, IL-12, IL-4, IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) at the stoma of the uterine
13 cervix of patients with high level of CIN, before and after the treatment with IFN α -2b
14 intralesional and evaluate the presence of HPV of high risk in responsive patients and
15 therapeutical failure, before and after the treatment.

16 **Casuistry and Methods:** Study group was composed by 10 patients ranging
17 from 18 to 50 years with a diagnosis of high-grade cervical intraepithelial neoplasia who
18 did not underwent previous treatment. In this work it was used Intralesional Human
19 recombinant Interferon α -2b 3.000.000 U (Blauferon B^R-Blausiegel). Applications were
20 done using a 1,0 ml syringe and 13 x 0,45 needle three times a week on alternate days
21 (Mondays, Wednesdays and Fridays), for 6 consecutive weeks, resulting in 18
22 applications. Biopsy collection was done before the first application and after the 18th one
23 of IFN α -2b. For analyzing the RNAm expression of the cytokines it was used the PCR
24 technique, using specific primers for each sequence of cytokines studied. After the PCR

1 reactions, amplified products were submitted to polyacrylamide gel electro-phoresis at
2 10% and stained in silver. Evaluation of the viral load of HPV was done by hybrid capture.

3 **Results:** At initial diagnosis 60% (n=6) of the patients were CIN II and 40%
4 (n=4) of them were CIN III. Related to the treatment response: 60% (n=6) had an answer
5 while 40% (n=4) had therapeutical failure. According to the habits and life conditions
6 questioned in the initial protocol (parity, smoking and number of sexual partners) its was
7 seen that 70% (n=7) were multiparas, 60% (n=6) were smokers and 50% (n=5) have
8 already had 3 or more sexual partners and the mean age of sexual intercourse was of 16,6
9 years (minimum of 14 and maximum of 18 years). About the expression of the cytokines
10 before and after the treatment with IFN α -2b we observed: lack of expression of cytokines
11 Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12), before the treatment with IFN α -2b in patients who
12 answered and also in those who failed the treatment. However, after the treatment with IFN
13 α -2b, we observed that responsive patients expressed IFN- γ , IL-2, TNF- α suggesting a
14 Th1 potential related to the healing. IL-10 expression (Th2) was absent in all patients,
15 before and after the treatment with IFN α -2b. IL-4 (Th2) was expressed before the
16 treatment with IFN α -2b, in 2 responsive patients and also in 2 patients who failed the
17 treatment. IL-4 expression, before the treatment with IFN α -2b, in patients with
18 therapeutical failure, suggests that the Th2 immune response might have contributed to the
19 persistence of the high level lesion. Yet, concomitant expression of IL-4 and TGF- β 3 in
20 patient with therapeutical failure after the treatment with IFN α -2b, suggests that the
21 immune response of Th3 may have modulated the Th2 immune response, avoiding a
22 satisfactory answer to the treatment. Related to the Messenger RNA expression of
23 cytokines TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, it was not possible to correlate the results with the
24 clinical response to the treatment with IFN α -2b, since one responsive patient presented
25 concomitant expression of TGF- β 1 and TGF- β 2 after the treatment with IFN α -2b, while

1 other two patients who did not answer to the treatment, expressed TGF- β 2 and TGF- β 3
2 after the treatment with IFN α -2b. We also observed that these patients with therapeutical
3 failure had concomitant expression of IL-12/TGF- β 2 and IL-4/TGF- β 3, suggesting that the
4 immune response of Th3 may had modulated the immune response of Th1 and Th2 during
5 the treatment with IFN and, because of that, there was a therapeutical failure. Controversial
6 results are found in works that analyze the presence of Th1, Th2 and Th3 cytokines in
7 premalignant cervical lesions. It was observed a significant fall of the viral load of high-
8 risk HPV in responsive patients ($p=0,0313$, Wilcoxon's test), after the treatment with IFN
9 α -2b.

10 **Conclusions:** Treatment with Intralesional IFN α -2b in patients with High-
11 level CIN had satisfactory clinical response in 60% of the patients. Th1 immune response
12 (IFN- γ , TNF- α , IL-2) seems to be related to the decrease of the level of CIN, after the
13 treatment with IFN α -2b in responsive patients. TGF- β expression after treatment with IFN
14 α -2b in patients with therapeutical failure suggests an immunomodulatory role of this
15 cytokine inhibiting the Th1 protector response. There was a significant decrease on the
16 HPV viral load of high risk in patients who answered the treatment with IFN α -2b.

Referências Bibliográficas

1 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2

- 3 ABBAS,A.K.;LICHTMAN, A.H. **Imunologia Básica. Funções e Distúrbios do sistema**
4 **imunológico.** 2.ed. Rio de Janeiro:Elsevier, 2007.cap.5.p.91-114.
- 5
- 6 AGGARWAL, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword.
7 **Nat. Rev. Immunol.**, v.3, n.9, p. 745-756, Sep.2003.
- 8
- 9 ANK, N.; WEST, H.; PALUDAN, S.R. IFN-lambda: novel antiviral cytokines. **J.**
10 **Interferon Cytokine Res.**, v. 26, n.6, p.373-379, June 2006.
- 11
- 12 ASHRAFUNNESSA; KAMAL, M. Cervical intraepithelial neoplasia and its relationship
13 with hormonal contraceptive methods. **Bangladesh Med. Res. Counc. Bull.**, v. 34, n. 1, p.
14 33-35, Apr. 2008.
- 15
- 16 ARVANITIS, D.A.; SPANDIDOS, D.A. Deregulation of the G1/S phase transition in
17 cancer and squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: a case control study.
18 **Oncol. Rep.**, v.20, n. 4, p. 751-760, Oct. 2008.
- 19
- 20 BAIS, A.G.; BECKMANN, I.; EWING, P.C.; EIJKEMANS, M.J.; MEIJER, C.J.;
21 SNIJDERS, P.J.; HELMERHORST, T.J. Cytokine release in HR-HPV(+) women without
22 and with cervical dysplasia (CIN II and III) or carcinoma, compared with HR-HPV(-).
23 controls. **Mediators Inflamm.**, suppl. 24147, 2007.
- 24
- 25 BAIS, A.G.; BECKMANN, I.; LINDEMANSJ; EWING, P.C.; MEIJER,C.J.; SNIJDERS,
26 P.J.; HELMERHORST, T.J. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the
27 carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. **J. Clin. Pathol.**, v.
28 58, n.10, p. 1096-1100, Oct. 2005.
- 29
- 30 BASU, P.; BISWAS, J.; MANDAL, R.; CHOUDHURY, P. Is interferon-alpha and
31 retinoic acid combination along with radiation superior to chemo-radiation in the treatment
32 of advanced carcinoma of cervix? **Indian J. Cancer**, v.43, n.2, p.54-59, 2006.
- 33
- 34 BEHTASH, N.; MEHRDAD, N. Cervical cancer: screening and prevention. **Asian Pac. J.**
35 **Cancer Prev.**, v.7, n.4, p.683-686, Oct./Dec. 2006.
- 36
- 37 BORDEN, E.C.; SEN, G.C.; UZÉ, G.; SILVERMAN, R.H.; RANSOHOFF, R.M.;
38 FOSTER,G.R.; STARK,G.R. Interferons at age 50: past, current and future impact on
39 biomedicine. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.6,n.12, p.975-990, Dec.2007.
- 40
- 41 BOSCH, F.X.; DE SANJOSÉ, S. The epidemiology of human papillomavirus infection
42 and cervical cancer. **Dis. Markers**.v.23, n.4, p.213-227, 2007.
- 43
- 44 BURD, E.M. Human Papillomavirus and cervical cancer. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.16, n.1,
45 p. 1-17, Jan. 2003.

- 1 BRENNA, S.M.; SYRJÄNEN, K.J. Regulation of cell cycles is of key importance in
2 human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. **Sao Paulo Med. J.**, v.
3 121, n.3, p. 128-132, May./Aug. 2003.
- 4
- 5 BRIDEAU-ANDERSEN, A.D.; HUANG, X.; SUN, S.C.; CHEN, T.T.; STARK, D.; SAS,
6 I.J.; *et al.* Directed evolution of gene-shuffled IFN-alpha molecules with activity profiles
7 tailored for treatment of chronic viral diseases. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 104, n.
8 20, p. 8269-8274, May 2007.
- 9
- 10 BROWN, D.R.; SHEW, M.L.; QADADRI, B.; NEPTUNE, N.; VARGAS, M.; TU, W.; *et
al.* A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely
11 followed adolescent women. **J. Infect. Dis.**, v. 191, n. 2, p. 182-192, Jan. 2005.
- 12
- 13 CALDEIRA, S.; DONG, W.; TOMMASINO, M. Analysis of E7/Rb associations.
14 **Methods Mol. Med.**, v. 119, p. 363-379, 2005.
- 15
- 16 CASTELLSAGUÉ, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical
17 cancer. **Gynecol. Oncol.**, v. 110, (3 Suppl 2):S4-7, Sep.2008.
- 18
- 19 CASTELLSAGUÉ, X.; MUNÓZ, N. Chapter 3: cofactors in human papillomavirus
20 carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **J. Natl. Cancer
Inst. Monogr.**, n.31, p.20-28, 2003.
- 21
- 22 CAZORLA, E.; URGAL, A.; CÓRDOBA, J.; BOLDÓ, A.; MARÍN, M.; SÁNCHEZ
23 GUTIÉRREZ, M.; *et al.* Immunomodulatory treatment with beta-interferon in patients
24 with cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection: long-term
25 follow-up. **Rev. Esp. Quimioter.**,v.18, n.1, p. 26-31, Mar. 2005.
- 26
- 27 CHAKALOVA,G.; GANCHEV, G. Local administration of interferon-alpha in cases of
28 cervical intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus infection. **J.
Buon.**, v.9, n.4, p.399-402, Oct./Dec.2004.
- 29
- 30 CHOO,Y.C.; SETO, W.H.; HSU,C.; TANY,Y.H.; MA, H.C.; NG, M.H. Cervical
31 intraepithelial neoplasia treated by perilesional injection of interferon. **Br. J. Obstet.
Gynaecol.**, v. 93, n.4, p.372-379, Apr.1986.
- 32
- 33 CINEL, A.; WITTENBERG, L.; MINUCCI, D. Beta-interferon topical treatment in low
34 and high risk cervical lesions. **Clin. Exp. Obstet. Gynecol.**, v.18, n.2, p.91-7, 1991.
- 35
- 36 CLERICI, M.; MEROLA, M.; FERRARIO, E.; TRABATTONI, D.; VILLA, M.L.;
37 STEFANON, B.; *et al.* Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia:
38 association with human papillomavirus infection. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.89, n.3, p.245-
39 250, Feb.1997.
- 40
- 41 CLIFFORD, G.M.; SMITH, J.S.; PLUMMER, M.; MUÑOZ, N.; FRANCESCHI, S.
42 Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. **Br. J.
Cancer**, v. 88, n.1, p.63-73, Jan.2003.
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47

- 1 CRISTINA, J.; DEL PILAR MOREN, M.; MORATORIO, G. Hepatitis C virus genetic
2 variability in patients undergoing antiviral therapy. **Virus Res.**, v. 127, n. 2, p.185-194,
3 2007.
- 4
- 5 CUSCHIERI, K.S.; CUBIE, H.A. The role of human papillomavirus testing in cervical
6 screening. **J. Clin. Virol.**, suppl 1:S34-42, Mar.2005.
- 7
- 8 CUZICK, J.; ARBYN, M.; SANKARANARAYANAN, R.; TSU,V.; RONCO, G.;
9 MAYRAND, M.H.; *et al.* Overview of human papillomavirus-based and other novel
10 options for cervical cancer screening in developed and developing countries. **Vaccine**,
11 suppl.10:K29-41,2008.
- 12
- 13 DA SILVA, C.S.; ADAD, S.J.; HAZARABEDIAN DE SOUZA, M.A.; MACÊDO
14 BARCELOS, A.C.; SARRETA, TERRA, A.P.; MURTA, E.F. Increased frequency of
15 bacterial vaginosis and Chlamydia trachomatis in pregnant women with human
16 papillomavirus infection. **Gynecol. Obstet. Invest.**, v. 58, n. 4, p. 189-193, Jul. 2004.
- 17
- 18 DE GRUIJL, T.D.; BONTKES, H. J.; VAN DEN MUYSENBERG, A.J.; VAN
19 OOSTVEEN, J.W.; STUKART, M.J.; VERHEIJEN, R.H.; *et al.* Differences in cytokine
20 mRNA profiles between premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. **Eur. J.
21 Cancer**, v. 35, n. 3, p. 490-497, Mar.1999.
- 22
- 23 DOMINGO, E.J.; NOVIANI, R.; NOOR, M.R.; NGELANGEL, C.A.; LIMPAPHAYOM,
24 K.K.; THUAN, T.V.; *et al.* Epidemiology and prevention of cervical cancer in Indonesia,
25 Malaysia, the Philippines, Thailand and Vietnam. **Vaccine**. suppl.12:M71-9, 2008.
- 26
- 27 DONALISIO, M.; CORNAGLIA, M.; LANDOLFO, S.; LEMBO, D. TGF-beta1 and IL-4
28 downregulate human papillomavirus-16 oncogene expression but have differential effects
29 on the malignant phenotype of cervical carcinoma cells. **Virus Res.**, v.132, n. 1-2, p. 253-
30 256, Mar.2008.
- 31
- 32 DOORBAR, J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. **Dis.
33 Markers.**, v.23, n.4, p.297-313, 2007.
- 34
- 35 DUNHAM, A.M.; McCARTNEY, J.C.; McCANCE, D.J.; TAYLOR, R.W. Effect of
36 perilesional injection of alpha-interferon on cervical intraepithelial neoplasia and
37 associated human papillomavirus infection. **J. R. Soc. Med.**, v. 83, n.8, p. 490-492,
38 Aug.1990.
- 39
- 40 EL-SHERIF, A.M.; SETH, R.; TIGHE, P.J.; JENKINS, D. Decreased synthesis and
41 expression of TGF-beta1, beta2, and beta3 in epithelium of HPV 16-positive cervical
42 precancer: a study by microdissection, quantitative RT-PCR, and immunocytochemistry. **J.
43 Pathol.**, v. 192, n.4, p. 494-501, Dec. 2000.
- 44
- 45 EL-SHERIF, A.M.; SETH, R.; TIGHE, P.J.; JENKINS, D. Quantitative analysis of IL-10
46 and IFN-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16
47 associated cervical precancer. **J. Pathol.**, v.195, n.2, p.179-185, Sept.2001.

- 1 FARZANEH, F.; ROBERTS, S.; MANDAL, D.; OLLIER, B.; WINTERS, U.;
2 KITCHENER, H.C.; *et al*. The IL-10 -1082G polymorphism is associated with clearance
3 of HPV infection. **BJOG.**, v.113, n.8, p. 961-964, Aug.2006.
- 4
- 5 FERRANTINI, M.; CAPONE, I.; BELARDELLI, F. Interferon-alpha and cancer:
6 mechanisms of action and new perspectives of clinical use. **Biochimie**, v.89, n.6-7, p. 884-
7 893, Jun./Jul.2007.
- 8
- 9 FONTAINE, J.; HANKINS, C.; MAYRAND, M.H.; LEFEVRE, J.; MONEY, D.;
10 GAGNON, S.; *et al*. High levels of HPV-16 DNA are associated with high-grade cervical
11 lesions in women at risk or infected with HIV. **Canadian Women's HIV Study Group.**
12 **AIDS.**, v.19, n. 8, p. 785-794, May 2005.
- 13
- 14 FRANCESCHI, S.; HERRERO, R.; CLIFFORD, G.M.; SNIJDERS, P.J.; ARSLAN, A.;
15 ANH, P.T.; *et al*. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence
16 in women worldwide. **Int.J. Cancer**, v.119, n.11, p. 2677-2684, Dec.2006.
- 17
- 18 FREGA, A.; STENTELLA, P.; DE IORIS, A.; PIAZZE, J.J.; FAMBRINI, M.;
19 MARCHIONNI, M.; *et al*. Young women, cervical intraepithelial neoplasia and human
20 papillomavirus: risk factors for persistence and recurrence. **Cancer Lett.**, v. 196, n.2, p.
21 127-134, Jul.2003.
- 22
- 23 GAIOTTI, D.; CHUNG, J.; IGLESIAS, M.; NEES, M.; BAKER, P.D.; EVANS, C.H.;
24 WOODWORTH, C.D. Tumor necrosis factor-alpha promotes human papillomavirus
25 (HPV) E6/E7 RNA expression and cyclin-dependent kinase activity in HPV-immortalized
26 keratinocytes by a ras-dependent pathway. **Mol. Carcinog.**,v.27, n.2, p. 97-109, Feb.2000.
- 27
- 28 GARNETT, T.O.; DUERKSEN-HUGHES, P.J. Modulation of apoptosis by human
29 papillomavirus (HPV) oncoproteins.. **Arch. Virol.**, v.151, n.12, p. 2321-2335, Dec. 2006.
- 30
- 31 GIULIANO, A.R.; HARRIS, R.; SEDJO, R.L.; BALDWIN, S.; ROE, D.; PAPENFUSS,
32 M.R.; *et al*. Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus
33 infections: The Young Women's Health Study. **J. Infect. Dis.**, v. 186, n.4, p. 462-469,
34 Aug. 2002.
- 35
- 36 GLAS, R.; FRANKSSON, L.; UNE, C.; ELORANTA, M.L.; OHLÉN, C.; ORN, A.; *et al*.
37 Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell
38 phenotype. An adaptive component of NK cell-mediated responses. **J. Exp. Med.**, v. 191,
39 n.1, p.129-138, Jan. 2000.
- 40
- 41 GONÇALVEZ, M.A.; DONADI, E.A. Immune cellular response to HPV: current
42 concepts. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v.8, n.1, p.1-9, Feb.2004.
- 43
- 44 GRISMONDI, G.L.; MASIN, G.; MARINI, A. β -Interferon in the therapy of cervico-
45 vaginal papilloma virus (HPV) infection associated with cervical intraepithelial neoplasia
46 (CIN). **Minerva Ginecol.**, Torino, v.47, n.12, p.527-529, Dec.1995.

- 1 GROSS, G.; IKENBERG, H.; PETRY, K.U.; PFISTER, H.; SCHNEEDE, P.; SCHÖFER,
2 H.; *et al* . Condyloma acuminata and other HPV-associated diseases of the genitals, anus
3 and urethra. **Hautarzt**, v.58, n.2, p.179-186, Feb. 2007.
- 4
- 5 GUO, M.; SNEIGE, N.; SILVA, E.G.; JAN, Y.J.; COGDELL, D.E.; LIN, E.; *et al* .
6 Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and
7 HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Mod.**
8 **Pathol.**, v.20, n.2, p. 256-266, Feb.2007.
- 9
- 10 HEBNER, C.M.; LAIMINS, L.A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of
11 pathogenesis and oncogenicity. **Ver. Méd. Virol.**, v.16, n.2, p.83-97, Mar./ Apr. 2006.
- 12
- 13 HOUGARDY, B.M.; VAN DER ZEE, A.G.; VAN DEN HEUVEL, F.A.; TIMMER, T.;
14 DE VRIES, E.G.; DE JONG, S. Sensitivity to Fas-mediated apoptosis in high-risk HPV-
15 positive human cervical cancer cells: relationship with Fas, caspase-8, and Bid. **Gynecol.**
16 **Oncol.**, v.97, n.2, p. 353-364, May 2005.
- 17
- 18 INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2008 incidência de câncer no**
19 **Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>>. Acesso em: 20 de
20 setembro 2008.
- 21
- 22 IWASAKA, T.; HAYASHI, Y.; YOKOYAMA, M.; HACHISUGA, T.; SUGIMORI, H.
23 Interferon gamma treatment for cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecol. Oncol.**, v.37,
24 n.1, p.96-102, Apr.1990.
- 25
- 26 KANODIA, S.; FAHEY, L.M.; KAST, W.M. Mechanisms used by human papillomavirus
27 to escape the host immune response. **Curr. Cancer Drug. Targets**, v. 7, n. 1, p. 79-89,
28 Feb.2007.
- 29
- 30 KATESMARK, M.; COULTER- SMITH, S.; REYNOLDS, K.; LAWTON, F. A pilot
31 study of the efficacy and tolerability of intralesional recombinant human beta-interferons
32 in cervical intraepithelial neoplasia. **Ann. Acad. Med. Singapore**, v.28, n.6, p.775-777,
33 Nov.1999.
- 34
- 35 KOBAYASHI, A.; GREENBLATT, R.M.; ANASTOS, K.; MINKOFF, H.; MASSAD,
36 L.S.; YOUNG, M.; *et al*. Functional attributes of mucosal immunity in cervical
37 intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. **Cancer Res.**, v.64, n.18, p. 6766-
38 6774, Sep.2004.
- 39
- 40 KOROMILAS, A.E.; LI, S.; MATLASHEWSKI, G. Control of interferon signaling in
41 human papillomavirus infection. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.12, n.2-3, p.157-170,
42 Jun./Sep.2001.
- 43
- 44 KUFE, D.; WEICHSELBAUM, R. Radiation therapy: activation for gene transcription and
45 the development of genetic radiotherapy-therapeutic strategies in oncology. **Cancer Biol.**
46 **Ther.**, v.2, n.4, p. 326-329, Jul/Aug 2003.
- 47
- 48 KUPPER, T.S.; FUHLBRIGGE, R.C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and
49 clinical consequences. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n.3, p. 211-222, Mar.2004.

- 1 LAI, C.R.; HSU, C.Y.; TSAY, S.H.; LI, A.F. Clinical significance of atypical glandular
2 cells by the 2001 Bethesda System in cytohistologic correlation. **Acta. Cytol.**, v.52, n.5, p.
3 563-567, Sep./Oct. 2008.
- 4
- 5 LAWSON, M.A. Human papillomavirus infection in adolescent and young women. **Mo.**
6 **Med.**, v.105, n.1, p. 42-46, Jan./Feb.2008.
- 7
- 8 LEE, B.N.; FOLLEN, M.; SHEN, D.Y.; MALPICA, A.; ADLER-STORTHZ, K.;
9 SHEARER, W.T.; *et al.* Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated
10 CD4+ T cells of women with human papillomavirus-related high-grade squamous
11 intraepithelial lesions. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.11, n.2, p. 239-44, Mar.2004.
- 12
- 13 LEMBO, D.; DONALISIO, M.; DE ANDREA, M.; CORNAGLIA, M.; SCUTERA, S.;
14 MUSSO, T.; *et al.* A cell-based high-throughput assay for screening inhibitors of human
15 papillomavirus-16 long control region activity. **FASEB. J.**, v. 20, n.1, p. 148-150,
16 Jan.2006.
- 17
- 18 LINDNER, D.J. Interferons as antiangiogenic agents. **Curr. Oncol. Rep.**, Philadelphia, v.4,
19 n.6, p. 510-514, Nov.2002.
- 20
- 21 LJUBOJEVIC, S.; LIPOZENCIC, J.; GRGEC, D.L.; PRSTACIC, R.; SKERLEV, M.;
22 MOKOS, Z.B. Human papilloma virus associated with genital infection. **Coll. Antropol.**,
23 v.32, n.3, p. 989-997, Sep.2008.
- 24
- 25 LONGWORTH, M.S.; LAIMINS, L.A. Pathogenesis of human papillomaviruses in
26 differentiating epithelia. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.68, n.2, p. 362-372, Jun.2004.
- 27
- 28 MAHER, S.G.; ROMERO- WEAVER, A.L.; SCARZELLO, A.J.; GAMERO, A.M.;
29 Interferon: cellular executioner or white knight? **Curr. Med. Chem.**, v.14, n.12, p. 1279-
30 1289, 2007.
- 31
- 32 MAJEWSKI, S.; HUNZELMANN, N.; NISCHT, R.; ECKES, B.; RUDNICKA, L.;
33 ORTH, G.; *et al.* TGF beta-1 and TNF alpha expression in the epidermis of patients with
34 epidermodysplasia verruciformis. **J. Invest. Dermatol.**, v.97, n.5, p. 862-867, Nov,1991.
- 35
- 36 MALATHI, K.; PARANJAPE, J.M.; BULANOVA, E.; SHIM, M.; GUENTHER-
37 JOHNSON, J.M.; FABER, P.W.; *et al.* A transcriptional signaling pathway in the IFN
38 system mediated by 2'-5'-oligoadenylate activation of RNase L. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.**
39 **S. A.** v.102, n.41, p.14533-14538, Oct.2005.
- 40
- 41 MARDEGAN, Marília de Carvalho. **Avaliação da resposta clínica e imunológica local**
42 **de pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical graus II e III tratadas com**
43 **interferon alfa-2B intralesional.** 2008. 98f. Dissertação (Mestrado em Patologia
44 Ginecológica e Obstétrica)- Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Triângulo
45 Mineiro, Uberaba, 2008.
- 46
- 47 MARKOWSKA, J.; FISCHER, N.; MARKOWSKI, M.; NALEWAJ, J. The role of
48 Chlamydia trachomatis infection in the development of cervical neoplasia and carcinoma.
49 **Med. Wiek. Rozwoj.**, v.9, n.1, p. 83-86, Jan./Mar.2005.

- 1 MATHEVET, P.; CHEMALI, E.; ROY, M.; DARGENT, D. Long-term outcome of a
2 randomized study comparing three techniques of conization: cold knife, laser, and LEEP.
3 **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.106, n. 2, p.214-218, Feb. 2003.
- 4
- 5 MICHELETTI, L.; BARBERO, M.; PRETI, M.; ZANOTTO VALENTINO, M.C.;
6 NICOLACI, P.; CORBELLÀ, L.; *et al.* Intra-lesion administration of beta-interferon in the
7 treatment of CIN associated with HPV infection. **Minerva Ginecol.**, v. 44, n.6, p.329-334,
8 June 1992.
- 9
- 10 MÜLLER, G.; SALOGA, J.; GERMANN, T.; BELLINGHAUSEN, I.;
11 MOHAMADZADEH, M.; KNOP, J.; *et al.* Identification and induction of human
12 keratinocyte-derived IL-12. **J. Clin. Invest.**, v.94, n.5, p. 1799-1805, Nov. 1994.
- 13
- 14 MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; DE SANJOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.;
15 SHAH, K.V.; *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated
16 with cervical cancer. **N. Engl. J. Med.**, v.348, n.6, p. 518-527, Feb.2003.
- 17
- 18 MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; DE GONZÁLEZ, A.B.; GISSMANN, L. Chapter 1:
19 HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**. suppl. 3: S3/1-10, 2006.
- 20
- 21 MURRAY, P.J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. **J**
22 **Immunol.**, v.178, n.5, p.2623-2629, Mar.2007.
- 23
- 24 MURTA, E.F.C.; TAVARES MURTA, B.M. Successful pregnancy after vaginal cancer
25 treated with interferon. **Tumori**, v.90, n.2, p.247-248, Mar./Apr. 2004.
- 26
- 27 MUSCAT, A.; HAWKINS, C.; ASHLEY, D.M. Caspase-8 levels correlate with the
28 expression of signal transducer and activator of transcription 1 in high-grade but not lower
29 grade neuroblastoma. **Cancer**, v.107, n.4, p.824-831, Aug.2006.
- 30
- 31 NARISAWA-SAITO, M.; KIYONO, T. Basic mechanisms of high-risk human
32 papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. **Cancer Sci.**, v.98,
33 n.10, p. 1505-1511, Oct. 2007.
- 34
- 35 NAUCLER, P.; RYD, W.; TÖRNBERG, S.; STRAND, A.; WADELL, G.; ELFGREN, K.;
36 *et al* . Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. **N. Engl.**
37 **J. Med.**, v.357, n.16, p.1589-1597, Oct .2007.
- 38
- 39 NGUYEN, H.H.; BROKER, T.R.; CHOW, L.T.; ALVAREZ, R.D.; VU, H.L.; ANDRASI,
40 J.; *et al*. Immune responses to human papillomavirus in genital tract of women with
41 cervical cancer. **Gynecol. Oncol.**, v.96, n.2, p. 452-461, Feb.2005.
- 42
- 43 NOMEINI, R.S.; MARDEGAN, M.C.; MURTA,E.F.C. Utilization of interferon in
44 gynecologic and breast cancer. **Clin. Med. Oncol.**, v.1,p.111-120, 2007.
- 45
- 46 OHTSUKA, Y.; SANDERSON, I.R. Transforming growth factor-beta: an important
47 cytokine in the mucosal immune response. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v.16, n.6, p. 541-
48 545, Nov.2000.

- 1 ONOGUCHI, K.; YONEYAMA, M.; TAKEMURA, A.; AKIRA, S.; TANIGUCHI, T.;
2 NAMIKI, H.; *et al.* Viral infections activate types I and III interferon genes through a
3 common mechanism. **J. Biol. Chem.**, n.282, n.10, p. 7576-7581, Mar.2007.
- 4
- 5 PAAVONEN, J. Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer
6 and related genital neoplasias. **Int. J. Infect. Dis.**, suppl 2:S3-9, 2007.
- 7
- 8 PARDO-GOVEA, T.; CALLEJAS, D.; NUÑEZ-TROCONIS, J.; ARAUJO, M.; COSTA,
9 L.; PONS, H.; *et al.* Gamma interferon (IFN-gamma), tumor necrosis factor alpha (TNF-
10 alpha) and interleukins 2, 4 and 6 (IL-2, IL-4, IL-6) in cervical-uterine cells of
11 intraepithelial neoplasia: a preliminary report. **Invest. Clin.**, Maracaibo, v.46, n.1, p. 5-13,
12 Mar.2005.
- 13
- 14 PENNA, C.; FALLANI, M.G.; GORDIGIANI, R.; SONNI, L.; TADDEI, G.L.;
15 MARCHIONNI, M. Intralesional beta-interferon treatment of cervical intraepithelial
16 neoplasia associated with human papillomavirus infection. **Tumori**, v.80, n.2, p.146-150,
17 Apr.1994.
- 18
- 19 PETERS, J.H.; GIESELER, R.; THIELE, B.; STEINBACH, F. Dendritic cells: from
20 ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. **Immunol. Today**. v.17, n. 6, p. 273-
21 278, Jun.1996.
- 22
- 23 PRÉTET, J.L.; CHARLOT, J.F.; MOUGIN, C. Virological and carcinogenic aspects of
24 HPV. **Bull.Acad. Natl. Med.**, v.191, n.3, p. 611-623, Mar.2007.
- 25
- 26 RAMOS, M.C.; DE LORENZO, B.H.; MICHELIN, M.A.; MURTA, E.F. High-grade
27 cervical intraepithelial neoplasia, human papillomavirus and factors connected with
28 recurrence following surgical treatment. **Clin. Exp. Obst. & Gyn.**, n.3, p. 242-247, May
29 2008.
- 30
- 31 RANDALL, R.E.; GOODBOURN, S. Interferons and viruses: an interplay between
32 induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. **J.Gen.Viro.**, v.89,
33 p.1, p.1-47, Jan.2008.
- 34
- 35 RESSING, M.E.; VAN DRIEL, W.J.; CELIS, E.; SETTE, A.; BRANDT, M.P.;
36 HARTMAN, M.; *et al.* Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with
37 human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-
38 A *0201-restricted E7-encoded epitope. **Cancer Res.**, v. 56, n.3, p.582-588, Feb.1996.
- 39
- 40 ROKITA, W. Colposcopy of abnormal transformation zone. **Wiad. Lek.**, v. 59, n. 7-8, p.
41 486-489, 2006.
- 42
- 43 ROTOLA, A.; COSTA, S.; DI LUCA, D.; STEFANON, B.; VILLANI,C.; MICHELETTI,
44 L.; *et al.* Beta-interferon treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a multicenter
45 clinical trial. **Intervirology**, v.38, n.6, p.325-331,1995.
- 46
- 47 ROUSE, B.T.; SUVAS, S. Regulatory cells and infectious agents: detentes cordiale and
48 contraire. **J .Immunol.**, v.173, n.4, p.2211-2215, Aug.2004.

- 1 RUNOWICZ, C.D.; LYMBERIS, S.; TOBIAS, D. Cervical Neoplasia and Cigarette
2 Smoking: Are They Linked? **Medscape Womens Health**, v.2, n.3, p.2. Mar.1997.
3
- 4 SAIDI, R.F.; WILLIANS, F.; NG, J.; DANQUAH, G.; MITTAL, V.K.; REMINE, S. G.; *et*
5 *al.* Interferon receptors and the caspase cascade regulate the antitumor effects of
6 interferons on human pancreatic cancer cell lines. **Am. J. Surg.**, v.191, n.3, p. 358-363,
7 Mar.2006.
- 8
- 9 SAMUEL,C.E. Antiviral actions of interferon. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, n.4, p.778-
10 809, Oct. 2001.
- 11
- 12 SCHEUNGRABER, C.; GLUTIG, K.; FECHTEL, B.; KUEHNE- HEID, R.; DUERST,
13 M.; SCHNEIDER, A. Inner border a specific and significant colposcopic sign for moderate
14 or severe dysplasia (cervical intraepithelial neoplasia 2 or 3). **J .Low. Genit. Tract. Dis.**,
15 v.13, n.1, p.1-4, Jan. 2009.
- 16
- 17 SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P.E.; JERONIMO, J.; RODRIGUEZ, A.C.; WACHOLDER,
18 S. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, v.370, n.9590, p. 890-907,
19 Sep.2007.
- 20
- 21 SCHINDLER, C.; PLUMLEE, C. Interferons pen the JAK-STAT pathway. **Semin.Cell.**
22 **Dev. Biol.**, v.19, n.4, p. 311-318, Aug .2008.
- 23
- 24 SCHRODER, K.; HERTZOG, P.J.; RAVASI, T.; HUME, D.A. Interferon-gamma: an
25 overview of signals, mechanisms and functions. **J. Leukoc. Biol.**, v.75, n.2, p. 163-189,
26 Feb.2004.
- 27
- 28 SCOTT, M.; NAKAGAWA, M.; MOSCICKI, A.B. Cell-mediated immune response to
29 human papillomavirus infection. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.8, n.2, p. 209-220,
30 Mar.2001.
- 31
- 32 SCOTT, M.E.; MA, Y.; KUZMICH, L.; MOSCICKI, A.B. Diminished IFN-gamma and
33 IL-10 and elevated Foxp3 mRNA expression in the cervix are associated with CIN 2 or 3.
34 **Int. J. Cancer.**, v.124, n.6, p.1379-1383, Mar.2009.
- 35
- 36 SHARMA, A.; RAJAPPA, M.; SAXENA, A.; SHARMA, M. Cytokine profile in Indian
37 women with cervical intraepithelial neoplasia and cancer cervix. **Int. J. Gynecol. Cancer.**,
38 v. 17, n.4, p. 879-885, Jul./Aug. 2007.
- 39
- 40 SHEU, B.C.; CHANG, W.C.; LIN, H.H.; CHOW, S.N.; HUANG, S.C. Immune concept of
41 human papillomaviruses and related antigens in local cancer milieu of human cervical
42 neoplasia. **J. Obstet. Gynaecol. Res.**, v.33, n.2, p.103-113, Apr.2007.
- 43
- 44 SIKORSKI, M.; ZRUBEK, H. Long-term follow-up of patients treated with recombinant
45 human interferon gamma for cervical intraepithelial neoplasia. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**,
46 v.82, n.2, p.179-185, Aug.2003.

- 1 SIKORSKI, M.; ZRUBEK, H. Recombinant human interferon gamma in the treatment of
2 cervical intraepithelial neoplasia (CIN) associated with human papillomavirus (HPV)
3 infection. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.**, v.24,n.2, p.147-150, 2003.
- 4
- 5 SLOTMAN, B.J.; HELMERHORST, T.J.; WIJERMANS, P.W.; CALAME, J.J.
6 Interferon-alpha in treatment of intraepithelial neoplasia of the lower genital tract: a case
7 report. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.27, n.4, p.327-333, Apr.1988.
- 8
- 9 SONG, S.H.; LEE, J.K.; LEE, N.W.; SAW, H.S.; KANG, J.S.; LEE, K.W. Interferon-
10 gamma (IFN-gamma): a possible prognostic marker for clearance of high-risk human
11 papillomavirus (HPV). **Gynecol. Oncol.**, v.108, n.3, p.543-548, Mar.2008.
- 12
- 13 SONG, S.H.; LEE, J.K.; SEOK, O.S.; SAW, H.S. The relationship between cytokines and
14 HPV-16, HPV-16 E6, E7, and high-risk HPV viral load in the uterine cervix. **Gynecol.**
15 **Oncol.**, v.104, n.3, p.732-738, Mar.2007.
- 16
- 17 SOUFLA, G.; SIFAKIS, S.; BARITAKI, S.; ZAFIROPOULOS, A.; KOUMANTAKIS,
18 E.; SPANDIDOS, D.A. VEGF, FGF2, TGFB1 and TGFBR1 mRNA expression levels
19 correlate with the malignant transformation of the uterine cervix. **Cancer Lett.**, v.221, n.1,
20 p.105-118, Apr. 2005.
- 21
- 22 STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine**. suppl 1:S16-22,
23 Mar. 2006.
- 24
- 25 STANLEY, M.A.; PETT, M.R.; COLEMAN, N. HPV: from infection to cancer. **Biochem.**
26 **Soc. Trans.**, v.35, pt.6, p.1456-1460, Dec.2007.
- 27
- 28 STELLATO, G. Intralesional recombinant alpha 2B interferon in the treatment of human
29 papillomavirus-associated cervical intraepithelial neoplasia. **Sex Transm Dis.** v.19, n.3,
30 p.124-126, May./Jun.1992.
- 31
- 32 SYRJÄNEN, K. New concepts on risk factors of HPV and novel screening strategies for
33 cervical cancer precursors. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.**, v.29, n.3, p.205-221, 2008.
- 34
- 35 SYRJÄNEN, K.; SHABALOVA, I.; PETROVICHEV, N.; KOZACHENKO, V.;
36 ZAKHAROVA, T.; PAJANIDI, J.; *et al.* Smoking is an independent risk factor for
37 oncogenic human papillomavirus (HPV) infections but not for high-grade CIN. **Eur. J.**
38 **Epidemiol.**, v.22, n.10, p. 723-735, Sep.2007.
- 39
- 40 SYRJÄNEN, S.; PURANEN, M. Human papillomavirus infections in children: the
41 potential role of maternal transmission. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, v.11, n.2, p.259-274,
42 2000.
- 43
- 44 TAVARES-MURTA, B.M.; DE RESENDE, A.D.; CUNHA, F.Q.; MURTA, E.F. Local
45 profile of cytokines and nitric oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical
46 intraepithelial neoplasia. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.138, n.1, p.93-99,
47 May 2007.

- 1 TAYLOR, B.N.; SAAVEDRA, M.; FIDEL, P.L. Jr. Local Th1/Th2 cytokine production
2 during experimental vaginal candidiasis: potential importance of transforming growth
3 factor-beta. **Med. Mycol.**, v.38, n.6, p.419-431, Dec.2000.
- 4
- 5 TERVVAHUTA, A.; SYRJÄNEN, S.; YLISKOSKI, M.; GOLD, L.I.; SYRJÄNEN, K.
6 Expression of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 in human papillomavirus
7 (HPV)-associated lesions of the uterine cervix. **Gynecol. Oncol.**, v.54, n.3, p. 349-356,
8 Sep.1994.
- 9
- 10 THYRELL, L.; ERICKSON, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; POKROVSKAJA, K.;
11 SANGFELT, O.; CASTRO, J.; *et al.* Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in
12 malignant cells. **Oncogene**.v.21, n.8, p.1251-1262, Feb.2002.
- 13
- 14 TRANBALOC, P. Natural history of precursor lesions of cervical cancer. **Gynecol.**
15 **Obstet. Fertil.**, v.36, n.6, p.650-655, Jun.2008.
- 16
- 17 Trottier, H.; Franco, E.L. The epidemiology of genital human papillomavirus
18 infection. **Vaccine**. suppl 1:S1-15, Mar.2006.
- 19
- 20 TSUKUI, T.; HILDESHEIM, A.; SCHIFFMAN, M.H.; LUCCI, J.; CONTOIS, D.;
21 LAWLER, P.; *et al.* Interleukin 2 production in vitro by peripheral lymphocytes in
22 response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology.
23 **Cancer Res.**, v. 56, n.17, p. 3967-3974, Sep.1996.
- 24
- 25 VANAKANKOVIT, N.; TANEEPANICHSKUL, S. Effect of oral contraceptives on risk
26 of cervical cancer. **J. Med. Assoc. Thai.**, v.91, n.1, p.7-12, Jan.2008.
- 27
- 28 VETRANO, G.; LOMBARDI, G.; DI LEONE, G.; PARISI, A.; SCARDAMAGLIA, P.;
29 PATE, G.; *et al.* Cervical intraepithelial neoplasia: risk factors for persistence and
30 recurrence in adolescents. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.**, v.28, n.3, p.189-192, 2007.
- 31
- 32 WISE-DRAPER, T.M.; WELLS, S.I. Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular
33 targets. **Front. Biosci.**, v.13, p. 1003-1017, Jan.2008.
- 34
- 35 WOODMAN, C.B.; COLLINS, S.I.; YOUNG, L.S. The natural history of cervical HPV
36 infection: unresolved issues. **Nat. Rev. Cancer**, v.7, n.1, p.11-22, Jan.2007.
- 37
- 38 WOODWORTH, C.D.; SIMPSON, S. Comparative lymphokine secretion by cultured
39 normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized, and carcinoma cell
40 lines. **Am. J. Pathol.**, v. 142, n.5, p. 1544-1555, May 1993.
- 41
- 42 WU, T.C.; KURMAN, R.J. Analysis of cytokine profiles in patients with human
43 papillomavirus-associated neoplasms. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.89, n.3, p. 185-187,
44 Feb.1997.
- 45
- 46 XI, L.F.; KIVIAT, N.B.; GALLOWAY, D.A.; ZHOU, X.H.; HO, J.; KOUTSKY, L.A.
47 Effect of cervical cytologic status on the association between human papillomavirus type
48 16 DNA load and the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3. **J. Infect. Dis.**, v.
49 198, n.3, p. 324-331, Aug. 2008

- 1 YORK, I.A.; ROCK, K.L. Antigen processing and presentation by the class I major
- 2 histocompatibility complex. **Annu. Ver. Immunol.**, v.14, p. 369-396,1996.
- 3
- 4 ZHENG, Z.M.; BAKER, C.C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-
- 5 transcription regulation. **Front. Biosci.**, v.11, p.2286-2302, Sep.2006.

Anexos

ANEXO A: Parecer consubstanciado aprovado pelo CEP (folha 1/3)

1/3



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

Parecer Consustanciado

PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA E CLÍNICA DE PACIENTES COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL DE ALTO GRAU TRATADAS COM INTERFERON α -2B INTRALESIONAL

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Eddie Fernando Cândido Murta

INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM

DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 23-06-2006

PROTOCOLO CEP/UFTM: 759

SUMÁRIO DO PROJETO

1. OBJETIVOS

1-Avaliar a resposta clínica de pacientes com Neoplasia Intraepitelial (NIC) de alto grau tratadas com interferon α -2B através de exame colposcópico e biópsia;

2-Correlacionar a resposta clínica destas pacientes com parâmetros imunológicos, como população celular presentes nas biópsias, antes, durante e após o tratamento, e com as citocinas produzidas pelas mesmas (produção de citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-2, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , TGF- β pelo córion cervical).

2. JUSTIFICATIVA

A imunidade inata ao HPV é mediada por vários mecanismos, dentre eles, a síntese de interferon (IFN), a ativação de macrófagos e de células natural Killer. O HPV pode interagir com o sistema imune (STANLEY *et al*, 2001; STERN *et al*,2000; KONYA and DILLNER,2001) e evadir ou inativar a resposta imune (TINDLE *et al*,2002; FRAZER *et al*,1999). São múltiplos os mecanismos de evasão do vírus: 1-o HPV não tem fase de disseminação sanguínea; 2-não causa lise de queratinócitos não induzindo assim resposta inflamatória; 3- a produção e liberação do vírus ocorrem nas células escamosas diferenciadas, distantes das citocinas e células imunocompetentes da submucosa.

Estudos envolvendo o γ - Interferon no tratamento das NICs apresentaram sucesso terapêutico(IWASAKA.T.*et al.*, 1990) mas o resultado a longo prazo foi inferior ao tratamento cirúrgico (SIKORKI.M.*et al.*,2003).

Em se tratando de neoplasia invasiva, MURTA *et al.*(2004) obteve cura de paciente com carcinoma invasivo de vagina tratado com interferon- α -2B intraleisional.

Resende A. D. e cols. estudando citocinas em secreção vaginal de pacientes com NIC e de pacientes com vaginose bacteriana observaram que houve um aumento significante de IL6 e IL8 no grupo de pacientes com NIC quando comparadas com o grupo com vaginose bacteriana.

Nenhum estudo, entretanto, avalia as alterações imunológicas ocasionadas pelo interferon no epitélio cervical e a relação dessas alterações com a resposta clínica ao tratamento.

3. DESCRIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Os grupos de estudo serão compostos por pacientes com idade entre 18 e 50 anos com diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical de alto grau não submetidas a tratamento prévio.

4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os critérios para inclusão será ausência de sangramento durante o exame, não utilização de antibióticos orais, fungicidas ou cremes vaginais durante os 30 dias anteriores; nenhuma atividade sexual por pelo menos dois dias antes do dia da coleta das amostras; e nenhuma história prévia de tratamento para HPV. Nas biópsias coletadas, também serão realizadas PCR para tipagem de HPV, e Obtenção e cultura de células para avaliação da resposta imune. Serão critérios de exclusão pacientes portadoras de doenças imunodepressoras, cardiopatias

Avenida Frei Paulino, 30 – 2º andar –CEA – Abadia - 38025-180-Uberaba-MG - Telefax (0**34)3318-5854
E mail cep@prodepe.fntm.br

ANEXO A: Parecer consubstanciado aprovado pelo CEP (folha 2/3)

2/3



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP

Parecer Consustanciado

PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA E CLÍNICA DE PACIENTES COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL DE ALTO GRAU TRATADAS COM INTERFERON α -2B INTRALESIONAL

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Eddie Fernando Cândido Murta

INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM

DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 23-06-2006

PROTOCOLO CEP/UFTM: 759

graves, alteração da função hepática ou renal, gestantes, relato de intolerabilidade ao interferon ou ausência de lesão visível à colposcopia.

5. ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA

Serão feitos os seguintes procedimentos que foram minuciosamente descritos no projeto original.

Aferição do pH vaginal

Colposcopia

Aplicação do interferon

Avaliação da resposta clínica

Aplicação do interferon

Avaliação da resposta clínica

PCR para tipagem do HPV

Protocolo de PCR

Ciclo de Amplificação de DNA

Técnica de Realização do Teste de Captura Híbrida

Obtenção e cultura de células das biópsias

Citometria de Fluxo

Análise Estatística: Será feita entre as amostras pré e pós tratamento através dos testes de Wilcoxon ou T pareado. Da mesma forma, nas comparações entre os grupos com boa ou má resposta, será feita entre as amostras pré e pós tratamento através dos testes de Mann-Whitney ou T de Student. O nível de significância será $< 0,05$.

6. ADEQUAÇÃO DAS CONDIÇÕES

Para atingirmos nossos Objetivos, pretendemos realizar um estudo prospectivo, que será realizado no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Ambulatório Maria da Glória pelas Disciplinas de Ginecologia e Obstetrícia, Imunologia e Patologia Cirúrgica. Neste estudo iremos incluir pacientes com Neoplasia Intraepitelial Cervical não submetidas a nenhum tratamento prévio.

7. ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS

O interferon α -2B pode levar a alterações nos níveis séricos de desidrogenase láctica e fosfatase alcalina e nos níveis de hemoglobina, leucócitos, plaquetas e, por isso essas substâncias serão dosadas uma vez por semana durante o tratamento para detecção precoce e se necessário interrupção imediata do tratamento.

A medicação pode ocasionar alguns efeitos colaterais como:

febre, calafrios, mal estar geral, mialgia, diminuição do apetite, diminuição dos leucócitos e da plaquetas, que se intensos levarão a suspensão imediata do tratamento.

Para manter a confidencialidade, as pacientes serão identificadas por números, não aparecendo em nenhum momento o nome das mesmas.

Avenida Frei Paulino, 30 – 2º. andar –CEA – Abadia - 38025-180-Uberaba-MG - Telefax (034)3318-5854
E-mail cep@prodepe.fmtm.br

ANEXO A: Parecer consubstanciado aprovado pelo CEP (folha 3/3)

3/3



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

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

Parecer Consustanciado

PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA E CLÍNICA DE PACIENTES COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL DE ALTO GRAU TRATADAS COM INTERFERON α -2B INTRALESIONAL

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Eddie Fernando Cândido Murta

INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM

DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 23-06-2006

PROTOCOLO CEP/UFTM: 759

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

Apesar dos possíveis efeitos colaterais com o uso da medicação, o sucesso terapêutico poupará a paciente de uma intervenção cirúrgica e dos riscos inerentes da mesma.

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

TOTAL 48.060,00

O Projeto será financiado pela Fapemig .

12. FORMA E VALOR DA REMUNERAÇÃO DO PESQUISADOR

Apenas o salário de professor titular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

13. ADEQUAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO FORMA DE OBTÉ-LO

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

PARECER DO CEP

Aprovado

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

DATA DA REUNIÃO

06-10-2006


João Batista Ribeiro
Coordenador

Avenida Frei Paulino, 30 – 2º andar – CEA – Abadia - 38025-180-Uberaba-MG - Telefax (0**34)3318-5854
E-mail cep@prodepe.fntm.br

ANEXO B: Protocolo do Projeto (folha 1/2)

Protocolo de Pesquisa

Expressão de citocinas no estroma cervical de pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau após tratamento com interferon α -2b intralesional.

Nome: _____ RG: _____

Endereço: _____ Tel: _____

Idade: _____ Paridade : _____ DUM : _____ Data: _____

Tabagismo: () Sim () Não

Uso de Antibióticos orais, antifúngicos ou cremes vaginais nos últimos 30 dias :

() Sim () Não

Uso de antiinflamatórios ou imunodepressores nos últimos 15 dias:

() Sim () Não

Método anticonceptivo em uso: _____

Relação sexual nos últimos 2 dias: () Sim () Não

Nº de parceiros sexuais: _____ Sexarca: _____

Início da aplicação do interferon (data): _____

Fim da aplicação do interferon (data): _____

Sintomatologia relatada durante o tratamento:

- cefaléia
- mialgia
- hipertemia
- astenia
- outros

VCE n° e laudo: _____

Biópsia n° e laudo: _____

Resposta Clínica: () Boa resposta () Falha Terapêutica

No caso de falha terapêutica tratamento posterior recomendado: _____

Carga Viral do HPV de alto risco:

Antes do tratamento com IFN α -2b	Após o tratamento com IFN α -2b

ANEXO B: Protocolo do Projeto (folha 2/2)

Resultado (X) da expressão das citocinas pelo estroma do colo uterino de pacientes com NIC de alto grau, tratadas com IFN α -2b intralesional.

	P (1) I F	P (2) I F	P (3) I F	P (4) I F	P (5) I F	P (6) I F	P (7) I F	P (8) I F	P (9) I F	P (10) I F
IFN-γ										
TNF-α										
IL-2										
IL-12										
IL-4										
IL-10										
TGF-β1										
TGF-β2										
TGF-β3										
Beta-actina										

P (Paciente) e Número de identificação

I (Início do tratamento, antes da 1^o aplicação do IFN α -2b)

F (Final do tratamento, após a 18^o aplicação do IFN α -2b)

ANEXO C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (folha 1/2)

TERMO DE ESCLARECIMENTO

Você tem um tipo de doença denominada neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) de alto grau e está sendo convidada a participar do estudo “Expressão de citocinas no estroma cervical de pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau após tratamento com IFN α -2b intralesional”. Os avanços na área de saúde ocorrem através de estudos como este, por isso sua participação é importante. O objetivo do estudo é:

- Tratar esta doença com uma medicação denominada INF α -2b que será administrada dentro da lesão no colo do útero 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 o estudo que estamos propondo, além dos que já são normalmente coletados para os exames de rotina. É também importante saber que:

- A medicação será aplicada 3 vezes por semana em dias alternados por 6 semanas (total de 18 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 de 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 ter 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 C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (folha 2/2)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e comprehendi 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 para participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.

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

Assinatura do voluntário ou seu
Representante legal

Documento de identidade

Assinatura do pesquisador Responsável
Marisa de Carvalho Ramos

Assinatura do pesquisador Orientador
Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

Telefone de contato dos pesquisadores: 3318-5326/ 3318-5565

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

ANEXO D: Fotos



Blaufenon B® Blausiegel (IPON)



Pipetas (IPON)



Termociclagr (IPON)



Aparelho para Eletroforese (IPON)



Kit coletor para realização de Captura Híbrida (IPON)

ANEXO E: Imagens colposcópicas das lesões antes e após o tratamento



Paciente 1 Antes do Tratamento



Paciente 1 Após o Tratamento (Resposta)



Paciente 2 Antes do Tratamento



Paciente 2 Após o Tratamento (Resposta)



Paciente 3 Antes do Tratamento



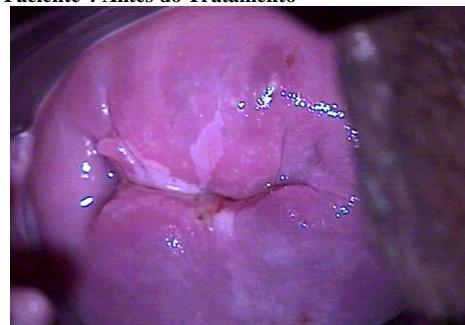
Paciente 3 Após o Tratamento (Resposta)



Paciente 4 Antes do Tratamento



Paciente 4 Após o Tratamento (Resposta)



Paciente 5 Antes do Tratamento



Paciente 5 Após o Tratamento (Falha)



Paciente 6 Antes do Tratamento



Paciente 6 Após o Tratamento (Resposta)



Paciente 7 Antes do Tratamento



Paciente 7 Após o Tratamento (Falha)



Paciente 8 Antes do Tratamento



Paciente 8 Após o Tratamento (Falha)



Paciente 9 Antes do Tratamento



Paciente 9 Após o Tratamento (Resposta)



Paciente 10 Antes do Tratamento



Paciente 10 Após o Tratamento (Falha)

R144e Ramos, Marisa de Carvalho
Expressão de citocinas no estroma cervical de pacientes
com neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau após tratamento com IFN α -2b
intralesional / Marisa de Carvalho Ramos. --2009.

96f.: tab.; graf.; fig.

Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) –
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta.

1.COLO DO ÚTERO.2.NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL
CERVICAL. 3.INTERFERON α -2b.4.IMUNOTERAPIA.I.Título.II.
MURTA, EDDIE FERNANDO CANDIDO.

CDU 618.146:577.245