

**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  $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 Candido 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 memoriam) 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 Candido Murta, pela oportunidade tão enriquecedora na minha formação.*

*Agradecimientos*

*Ao Professor, Dr. Eddie Fernando Candido 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 secretária 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 TECHNOLOGIES. ....	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 $\alpha$ -2b. ....	56

5.2 PERFIL DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM IFN $\alpha$ -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 <sup>R</sup> -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- $\gamma$ (4A), TNF- $\alpha$ (4B), IL-2 (4C), IL-12 (4D), IL-4 (4E), IL-10 (4F), TGF- $\beta$ 1 (4G), TGF- $\beta$ 2 (4H), TGF- $\beta$ 3 (4I) e Beta-actina (4J).....	61
Figura 5. Número de pacientes que responderam ou não ao tratamento com IFN $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -2b. ....	57
Tabela 2. Carga viral do HPV de alto risco, em amostras colhidas antes e após o tratamento com IFN $\alpha$ -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 $\alpha$ -2b. ....	62
Tabela 4. Expressão de citocinas, antes e após o tratamento com IFN $\alpha$ -2b nas pacientes que responderam ou não ao tratamento. ....	63

# *Lista de Abreviaturas*

APCs: Células Apresentadoras de Antígenos

$\alpha$ : alfa

$\beta$ : beta

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar

°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

$\gamma$ : gama

HPV: Papilomavírus humano

IFN: interferon

IFNAR1: Receptor de Interferon alfa tipo 1

IFNAR2: Receptor de Interferon alfa tipo 2

IFNGR1: Receptor de Interferon gama tipo 1

IFNGR2: 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

$\lambda$ : 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- $\beta$ 1: Fator Transformador de Crescimento  $\beta$  1

TGF- $\beta$ 2: Fator Transformador de Crescimento  $\beta$  2

TGF- $\beta$ 3: Fator Transformador de Crescimento  $\beta$  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. INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER DO COLO UTERINO

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

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

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

A NIC I regride na maioria dos casos, enquanto 20-45% das lesões NIC II e NIC III progridem para o câncer cervical quando não tratadas. Estima-se uma progressão 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; MUNÓZ *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).

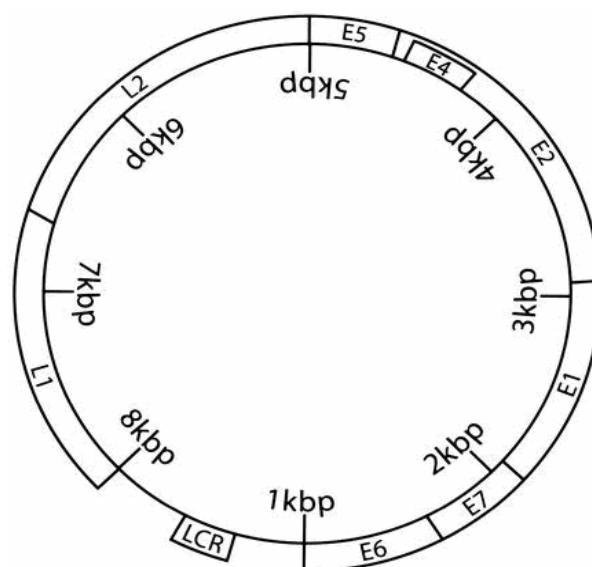
16 Histologicamente, a NIC I se caracteriza pela presença de atipias celulares  
17 leves acometendo apenas 1/3 do epitélio basal; na NIC II observam-se anormalidades  
18 nucleares mais acentuadas e mitoses numerosas que se estendem até os 2/3 proximais do  
19 epitélio; na NIC III as anormalidades 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

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

## 1.2 PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV)

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



**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).

### 1.2.1 Epidemiologia do HPV

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

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

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

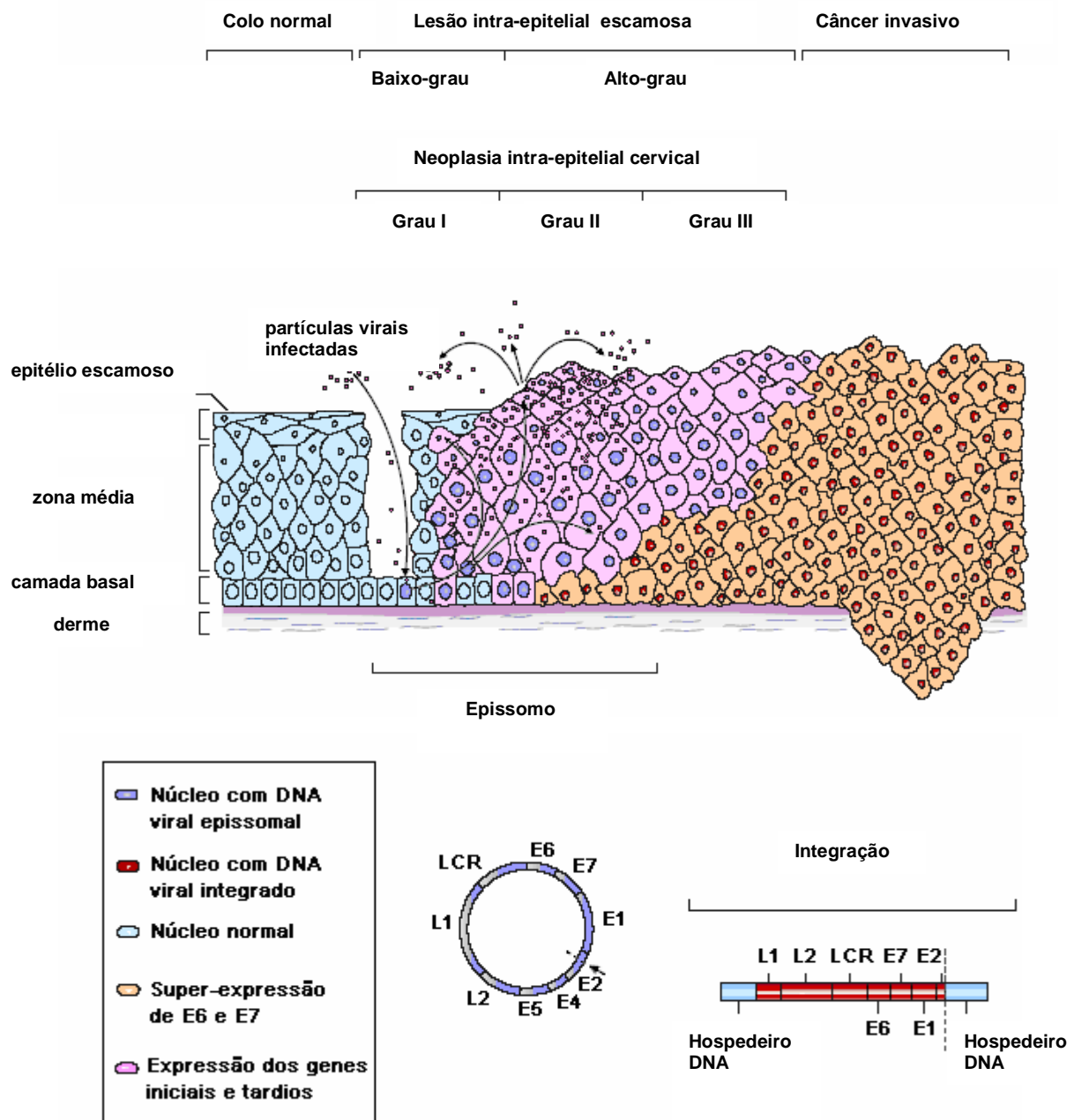
As infecções clínicas mais comuns ocorrem na região genital e são facilmente transmitidas sendo representadas pelas verrugas ou condilomas acuminados. Já as lesões subclínicas não apresentam sintomatologia, podendo progredir para o câncer do colo do útero caso não sejam identificadas e tratadas precocemente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

Segundo MUNÓZ *et al.* (2006) o HPV se adapta perfeitamente ao tecido hospedeiro em células epiteliais diferenciadas da pele ou mucosa. As partículas virais infectam, em particular, as células metaplásicas cervicais, que lhe são suscetíveis através do contato sexual com parceiro portador da infecção viral em suas formas clínica e subclínica, desencadeando um processo de hiperplasia de células basais. O genoma viral é 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  
 6 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 epissomal. 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; MUNÕZ *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).

### 1.2.2 Mecanismos de evasão imunológica do HPV

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

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

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

A infecção pelo HPV não é acompanhada por inflamação e não há nenhum “sinal de perigo” para alertar o sistema imunológico sobre a presença do vírus, resultando em uma infecção crônica e persistente (GIULIANO *et al.*, 2002). As células dendríticas hospedeiras são expostas aos baixos níveis de proteínas virais em um meio não-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 efectoras 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<sup>+</sup> podem se diferenciar em subpopulações de  
4 células efectoras que produzem grupos distintos de citocinas, como as subpopulações Th1,  
5 Th2 e Th3 (ABBAS & LITCHMAN, 2007).

6 As células Th1 secretam IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , 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<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, expressa o fator de transcrição FoxP3 que secreta IL-10 e TGF- $\beta$ .  
14 Essas células podem reconhecer auto-antígenos, regular respostas para antígenos exógenos  
15 e provocar infecções virais crônicas e imunopatológicas (ROUSE & SUVAS, 2004).

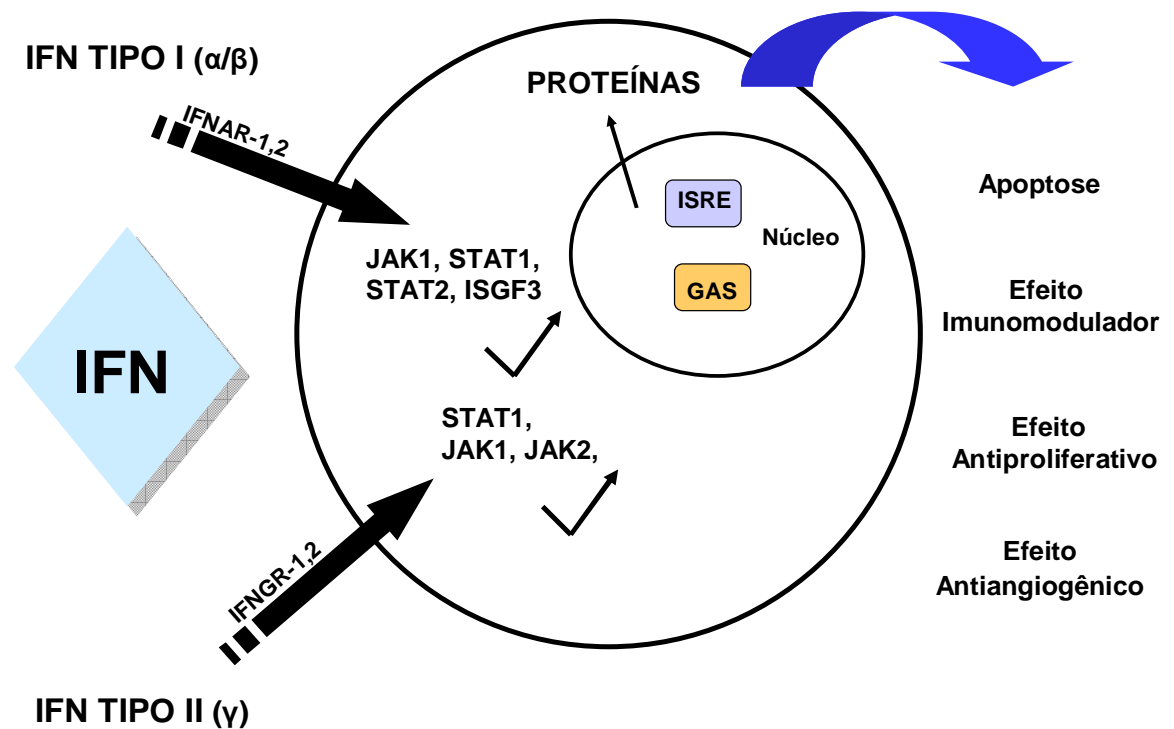
16 Vários estudos vêm sendo desenvolvidos buscando avaliar a produção de  
17 citocinas pelo colo uterino em pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical associada à  
18 infecção pelo HPV e buscando avaliar o papel de determinadas citocinas na progressão das  
19 NICs (EL-SHERIF *et al.*, 2001;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

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

O IFN tipo I está associado à ação antiviral e inclui o IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ; o IFN tipo II incrementa a atividade imunológica e inclui apenas o IFN- $\gamma$  (BRIDEAU-ANDERSEN *et al.*, 2007; SAMUEL, 2001); já o IFN tipo III compreende o IFN- $\lambda$ 1, - $\lambda$ 2, - $\lambda$ 3 e também apresenta ação antiviral (ANK *et al.*, 2006; ONOBUCHI *et al.*, 2007).

Todos os IFNs tipo I ( $\alpha/\beta$ ) se ligam ao mesmo receptor, que é composto de duas subunidades IFNAR1 e IFNAR2. O IFN tipo II ( $\gamma$ ) se liga ao receptor IFNGR, composto de duas subunidades IFNGR1 e IFNGR2 (SCHRODER *et al.*, 2004). Os receptores de IFN tipo I estão associados à enzima tirosina-quinase (TYK) que são fosforiladas em outras tirosina-quinases (Janus-quinases) JAK1 e JAK2, que por sua vez fosforilam Stat 1 e Stat 2 (MURRAY, 2007). Essas Stats (transdutor de sinal e ativador da família de transcrição) recrutadas, formam o complexo denominado fator genético 3 estimulador de IFN (ISGF3), que é direcionado ao núcleo e induz a transcrição dos genes portadores do elemento responsável pela estimulação do interferon (ISRE) e da sequência ativadora de IFN- $\gamma$  (GAS) (SCHINDLER & PLUMLEE, 2008).



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

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

Um dos papéis mais importantes dos interferons na promoção de respostas imunológicas protetoras é a capacidade de regulação da expressão das proteínas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). A maioria dos antígenos tumorais que promovem respostas imunológicas são proteínas citosólicas sintetizadas de maneira endógena, apresentadas como peptídeos associados ao MHC de classe I. Portanto, esses antígenos são reconhecidos por CTLs CD8+ restritos ao MHC da classe I, cuja função é a 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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  no  
5 tratamento das NICs.

6               Trabalhos utilizando interferon- $\beta$  (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- $\gamma$  (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  $\alpha$ -2b intralesional MURTA & MURTA (2004) obtiveram completa regressão  
13 da lesão vaginal.

14              Interferon- $\alpha$  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- $\gamma$  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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -2b intralesional.

*Objetivos*

### 1    **3. OBJETIVOS**

2

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

*Casuística e Métodos*

## 4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

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

### 4.1 CASUÍSTICA

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

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



1 maior que 1 cm<sup>2</sup> 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 cm<sup>2</sup>).

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<sup>®</sup>).

16 Os fragmentos coletados foram imersos em 1,0 ml de TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>TM</sup>,  
17 life technologies, 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  $\alpha$ -2b humano recombinante 3.000.000 U  
4    (Blauferon B<sup>R</sup>Blausiegel). A caixa da medicação é composta de um frasco-ampola com  
5    pó líofilo 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 antissepsia do colo e paredes vaginais com gaze embebida em polvidine  
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

## 17    **4.3 EXTRAÇÃO DE RNA DOS FRAGMENTOS ARMAZENADOS EM TRIZOL<sup>®</sup>**

### 18    **UTILIZANDO O PROTOCOLO DA INVITROGEN<sup>™</sup> LIFE TECHNOLOGIES.**

19

20           As amostras imersas em TRIZOL<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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  $\mu$ l de

1 clorofórmio para cada 1,0 ml de TRIZOL<sup>®</sup> 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.

#### 6 **4.3.1 Obtenção do RNA**

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.

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

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<sup>TM</sup> conforme protocolo do fabricante.

21 O RNA seco era, então, homogeneizado novamente em 15,0 ul de H<sub>2</sub>O 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 dt .....0,5 ul
- 2 RNA.....10,0 ul
- 3 Dntp .....1,0 ul
- 4 H<sub>2</sub>O DEPC .....3,0 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<sup>®</sup> First-Standard 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 5x .....4,0 ul
- 15 DTT 0,1mol .....1,0 ul
- 16 Enzima Superscrip IIIrt .....1,0 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- $\gamma$ ,  
 24 TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-12, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 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- $\gamma$  com volume final de 50  $\mu$ l:

5

6 Tampão 10x ..... 5,0  $\mu$ l

7 dntp 10mM..... 0,32  $\mu$ l

8 MgCl<sub>2</sub> 50mM..... 1,5  $\mu$ l

9 Taq DNA polimerase ..... 0,2  $\mu$ l

10 *primer* 1 ..... 1,0  $\mu$ l

11 *primer* 2 ..... 1,0  $\mu$ l

12 CDNA 100ng ..... 1,0  $\mu$ l

13 H<sub>2</sub>O DEPC p/50  $\mu$ l ..... 39,98  $\mu$ l

14

15 Componentes utilizados para amplificação da TNF- $\alpha$  com volume final de 25  $\mu$ l:

16

17 Tampão 10x ..... 2,5  $\mu$ l

18 dntp 10mM ..... 0,15  $\mu$ l

19 MgCl<sub>2</sub> 50mM..... 0,75  $\mu$ l

20 Taq DNA polimerase..... 0,3  $\mu$ l

21 *primer* 1 ..... 1,0  $\mu$ l

22 *primer* 2 ..... 1,0  $\mu$ l

23 CDNA 100ng ..... 1,0  $\mu$ l

24 H<sub>2</sub>O DEPC p/25  $\mu$ l ..... 18,3  $\mu$ l

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 MgCl<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O 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 MgCl<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O 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	MgCl <sub>2</sub> 50mM.....	0,75 ul
2	Taq DNA polimerase.....	0,5 ul
3	<i>primer 1</i> .....	1,0 ul
4	<i>primer 2</i> .....	1,0 ul
5	CDNA 100ng .....	1,2 ul
6	H <sub>2</sub> O 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	MgCl <sub>2</sub> 50mM.....	0,75 ul
13	Taq DNA polimerase.....	0,3 ul
14	<i>primer 1</i> .....	1,0 ul
15	<i>primer 2</i> .....	1,0 ul
16	CDNA 100ng .....	1,0 ul
17	H <sub>2</sub> O DEPC p/25 ul.....	18,3 ul
18		
19	Componentes utilizados para amplificação do TGF- $\beta$ 1 com volume final de 25 ul:	
20		
21	Tampão 10x .....	2,5 ul
22	dntp 10mM.....	0,15 ul
23	MgCl <sub>2</sub> 50mM.....	0,75 ul
24	Taq DNA polimerase.....	0,5 ul
25	<i>primer 1</i> .....	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- $\beta$ 2 com volume final de 25 ul:
  - 6
  - 7 Tampão 10x ..... 2,5 ul
  - 8 dntp 10mM..... 0,15 ul
  - 9 MgCl<sub>2</sub> 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-  $\beta$ 3 com volume final de 25 ul:
  - 17
  - 18 Tampão 10x ..... 2,5 ul
  - 19 dntp 10mM..... 0,15 ul
  - 20 MgCl<sub>2</sub> 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	MgCl <sub>2</sub> 50mM..... 0,75 ul
7	Taq DNA polimerase..... 0,2 ul
8	<i>primer 1</i> ..... 1,0 ul
9	<i>primer 2</i> ..... 1,0 ul
10	Kcl 48 mm ..... 1,61 ul
11	CDNA 100ng ..... 1,0 ul
12	H <sub>2</sub> O 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 sequência dos iniciadores, a temperatura de

21 anelamento e o tamanho do produto amplificado final para cada *primer*.

1

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>	<i>Temperatura de Anelamento</i>	<i>Tamanho do Produto Amplificado</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	(F):TCT GCA TCG TTT TGG GTT CTC (R):TCA GCT TTT CGA AGT CAT CTC	55	321pb
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	(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
<b>IL-2</b>	(F): ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT T (R): GTC AGT GTT GAG ATG ATG CTT TGA C	66	457pb
<b>IL-12</b>	(F): AGT GTC AAA AGC AGC AGA GG (R): AAC GCA GAA TGT CAG GGA G	66	363 pb
<b>IL-4</b>	(F):CCT CTG TTC TTC CTG CTA GCA (R): GCC GTT TCA GGA ATC GGA TCA	56	300 pb
<b>IL-10</b>	(F): ACA GCT CAC CAC TGC TCT GT (R): AGT TCA CAT GCG CCT TGA TG	58	327pb
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	(F): ACC AAC TAT TGC TTC AGC TC (R): TTA TGC TGG TTG TAC AGG	55	198 pb
<b>TGF- <math>\beta</math>2</b>	(F): CTG TCC CTG CTG CAC TTT TGT (R): TCT TCC GCC GGT TGG TCT GTT	60.4	227pb
<b>TGF- <math>\beta</math>3</b>	(F): CCT TTC AGC CCA ATG GAG AT (R): ACA CAG CAG TTC TCC TCC AA	61.2	241pb
<b>Beta-actina</b>	(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.

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

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 desoxirribonucleico (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 ectocérvis 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<sup>®</sup> 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<sup>R</sup> 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  $\alpha$ -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 e 10). Das pacientes NIC II, 66,6% (n=4) responderam ao  
11    tratamento com IFN  $\alpha$ -2b e 33,4% (n=2) tiveram falha terapêutica. Das pacientes NIC III,  
12    50% (n=2) responderam ao tratamento com IFN  $\alpha$ -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  $\alpha$ -2b.**

3  
4            O diagnóstico inicial e final de todas as pacientes tratadas com IFN  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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			

## 5.2 PERFIL DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM IFN $\alpha$ -2b INTRALESIONAL

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

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

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

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

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

A análise da expressão da IL-4 mostra a presença do fragmento em 300 pb. Das 20 amostras analisadas foi observado positividade na pacientes 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).

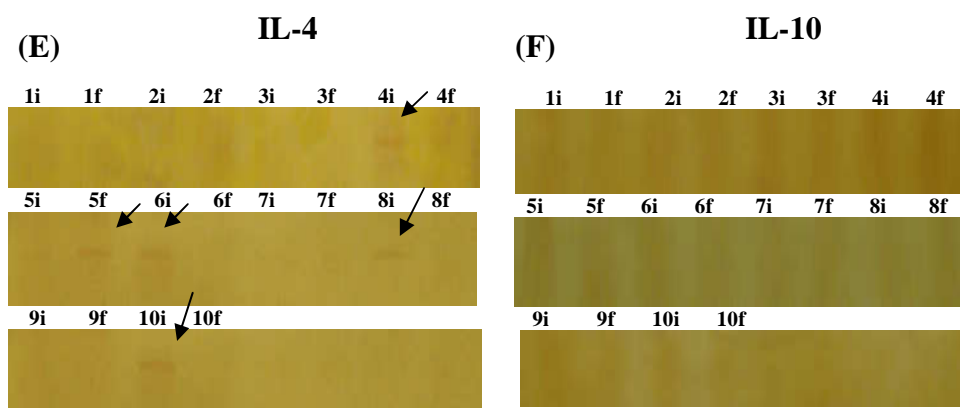
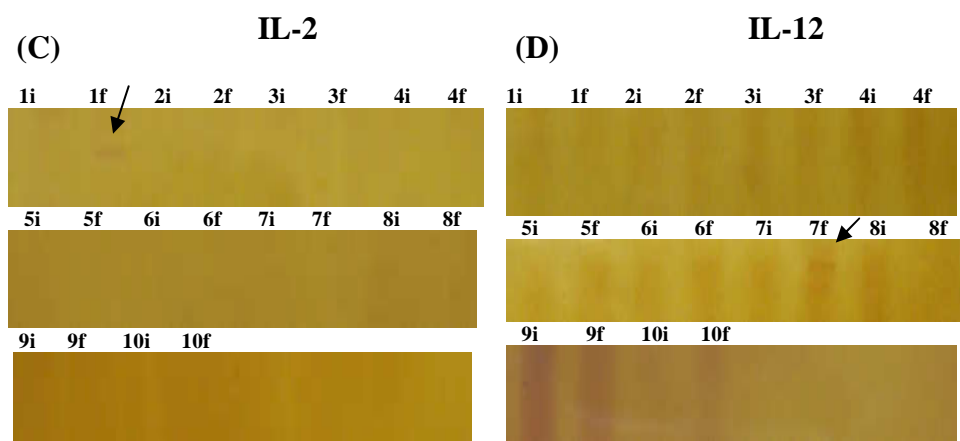
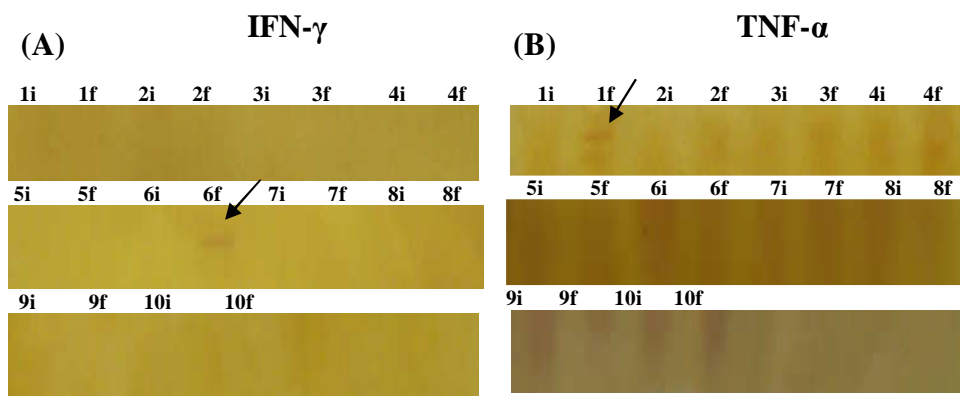
5 A análise da expressão do TGF- $\beta$ 1 mostra a presença do fragmento em 198 pb.  
6 Das 20 amostras analisadas apenas a paciente 4, amostra final (4f), apresentou positividade  
7 (Figura 4G).

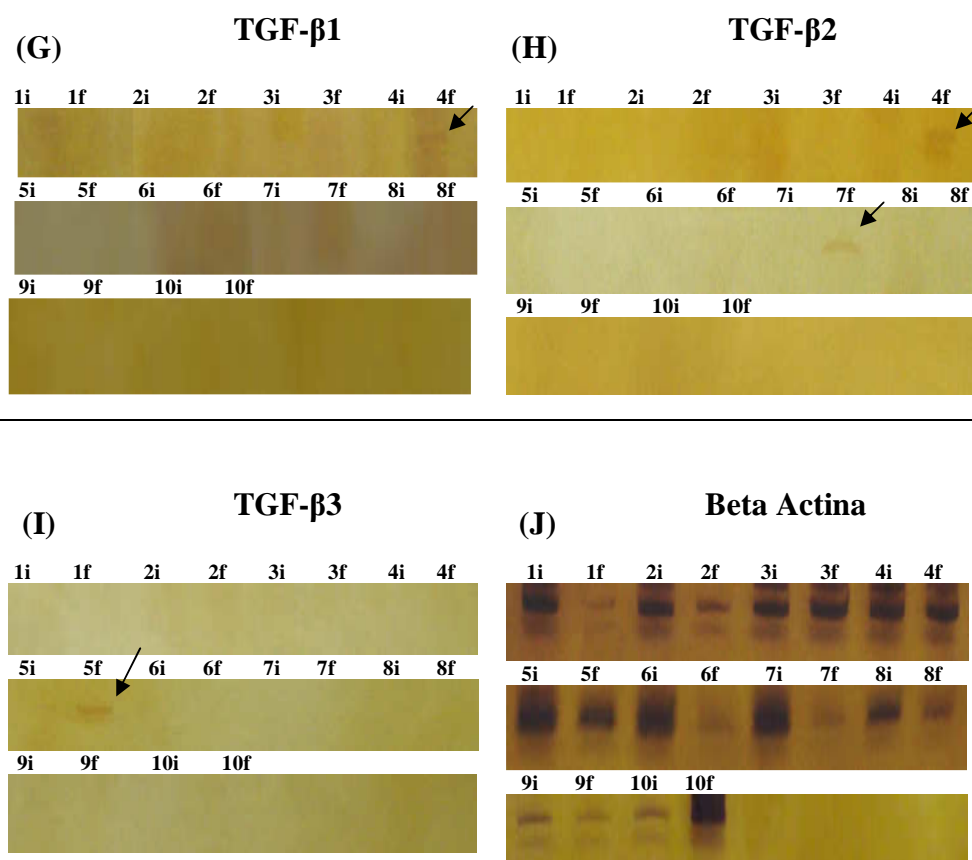
8 A análise da expressão do TGF- $\beta$ 2 mostra a presença do fragmento em 227 pb.  
9 Das 20 amostras analisadas foi observado positividade nas pacientes 4, amostra final (4f), e  
10 na paciente 7, amostra f (7f) (Figura 4 H).

11 A análise da expressão do TGF- $\beta$ 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 significativa na expressão das citocinas no estroma cervical das pacientes com NIC de alto  
18 grau, antes e após o tratamento com IFN  $\alpha$ -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- $\gamma$  (4A), TNF- $\alpha$  (4B), IL-2 (4C), IL-12 (4D), IL-4 (4E), IL-10  
4 (4F), TGF- $\beta$ 1 (4G), TGF- $\beta$ 2 (4H), TGF- $\beta$ 3 (4I) e Beta-actina (4J).

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

		Boa Resposta			Falha		
		Antes Tto	Após Tto	*p	Antes Tto	Após Tto	*p
IFN- $\gamma$	Pos	0	1	1,000	0	0	n.d.
	Neg	6	5		4	4	
TNF- $\alpha$	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- $\beta$ 1	Pos	0	1	1,000	0	0	n.d.
	Neg	6	5		4	4	
TGF- $\beta$ 2	Pos	0	1	1,000	0	1	1,000
	Neg	6	5		4	3	
TGF- $\beta$ 3	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.

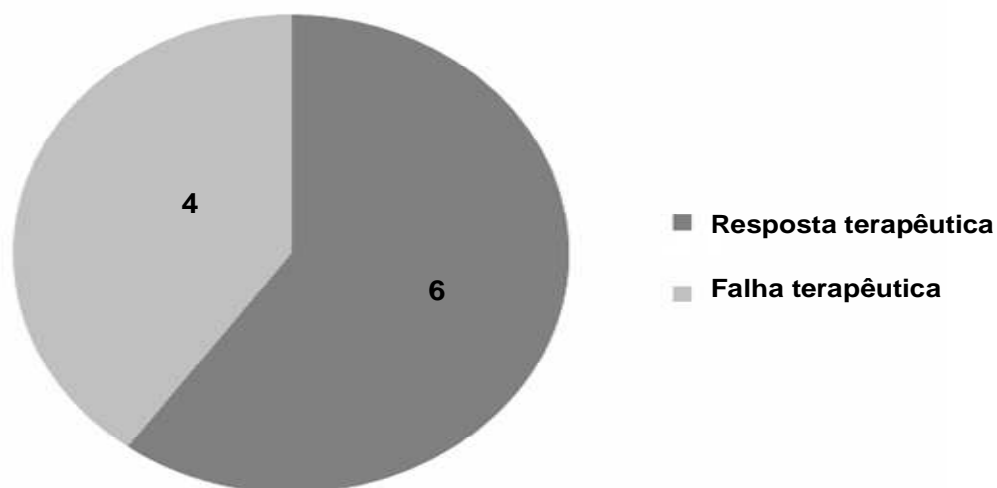
- 1 **Tabela 4.** Expressão de citocinas, antes e após o tratamento com IFN  $\alpha$ -2b nas pacientes  
 2 que responderam ou não ao tratamento.

		Antes Tratamento			Após Tratamento		
		Resposta	Falha	*p	Resposta	Falha	*p
IFN- $\gamma$	Pos	0	0	**n.d.	1	0	1,000
	Neg	6	4		5	4	
TNF- $\alpha$	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- $\beta$ 1	Pos	0	0	n.d.	1	0	1,000
	Neg	6	4		5	4	
TGF- $\beta$ 2	Pos	0	0	n.d.	1	1	1,000
	Neg	6	4		5	3	
TGF- $\beta$ 3	Pos	0	0	n.d.	0	1	0,4
	Neg	6	4		6	3	

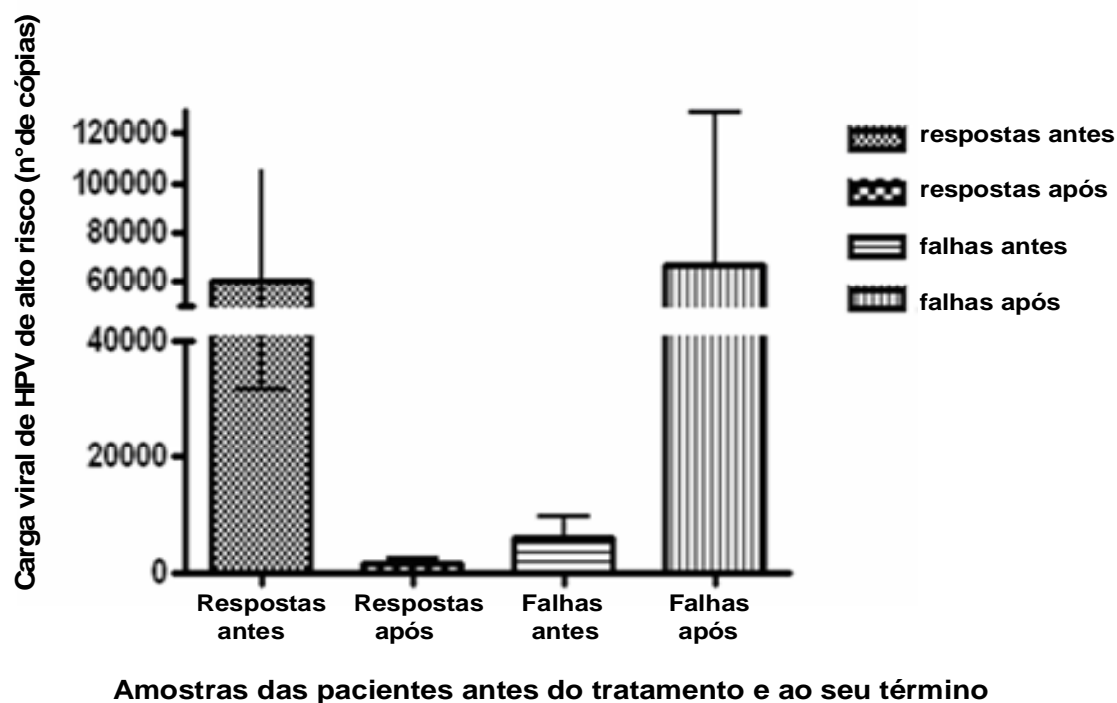
- 3 \*Teste exato de Fisher. \*\*n.d. = não determinado, devido aos valores iguais a zero.



## Resposta Clínica



1 **Figura 5.** Número de pacientes que responderam ou não ao tratamento com IFN  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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    MUNÓZ *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; CASTELLSAQUÉ & 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -  
18    2b no tratamento de paciente com carcinoma epidermal invasivo de vagina, com regressão  
19    total da lesão.

20                  Administrando IFN- $\beta$  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- $\beta$  intralesional em 41 pacientes com NIC  
23    e obtiveram cura em 33 (80%) das pacientes. CINEL *et al.*, (1991) usando gel de interferon  
24     $\beta$  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- $\gamma$  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- $\gamma$ , 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<sup>R</sup>Blausiegel, sendo esses efeitos  
12 abordados em outros trabalhos (MAHER *et al.*, 2007; STELLATO,1992). Efeitos  
13 colaterais como diarreia, 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  $\alpha$ -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- $\gamma$ . 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- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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<sup>+</sup> 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- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  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  $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12) antes do tratamento com IFN  $\alpha$ -2b nas pacientes que responderam  
9 e também nas que falharam ao tratamento. No entanto, após o tratamento com IFN  $\alpha$ -2b,  
10 observamos que pacientes que responderam ao tratamento expressaram IFN- $\gamma$  (6f) e IL-2/  
11 TNF- $\alpha$  (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- $\gamma$  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

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

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

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

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

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

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



1  $\beta 1$  e TGF-  $\beta 2$  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-  $\beta 1$  e de seu receptor  
4 TGF $\beta$ 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- $\beta 1$ , TGF- $\beta 2$  e TGF- $\beta 3$  com a resposta clínica ao tratamento com IFN  
8  $\alpha$ -2b, uma vez que 1 paciente com resposta satisfatória (4f) apresentou expressão  
9 concomitante do TGF- $\beta 1$  e TGF- $\beta 2$  após o tratamento com IFN  $\alpha$ -2b, enquanto outras duas  
10 pacientes que não responderam ao tratamento (5f e 7f) expressaram TGF- $\beta 2$  e TGF- $\beta 3$ ,  
11 após o tratamento com IFN  $\alpha$ -2b. As citocinas Th3 expressas após o tratamento com IFN  
12  $\alpha$ -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- $\beta 2$  (7f) e IL-4/TGF- $\beta 3$  (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  $\alpha$ -2b, resultando em falha terapêutica. No entanto, a  
23 expressão de citocinas Th1 em pacientes com resposta satisfatória após o tratamento com  
24 IFN  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -2b intralesional nas pacientes com NIC de alto grau,  
4        obteve resposta clínica satisfatória em 60% das pacientes.

5

6        2- A resposta imune Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) parece estar relacionada à diminuição  
7        do grau da NIC, após o tratamento com IFN  $\alpha$ -2b nas pacientes com boa resposta.

8

9        3- A expressão de TGF- $\beta$ , após o tratamento com IFN  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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- $\gamma$ ,  
13   TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-12, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3) no estroma do colo uterino  
14   de pacientes com NIC de alto grau, antes e após o tratamento com IFN  $\alpha$  -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  $\alpha$ -2b humano  
20   recombinante 3.000.000 U (Blauferon B<sup>R</sup> 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<sup>o</sup> aplicação e após a 18<sup>o</sup>  
24   aplicação do IFN  $\alpha$ -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  $\alpha$ -2b, observamos: ausência da expressão das citocinas  
13 Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12), antes do tratamento com IFN  $\alpha$ -2b nas pacientes que  
14 responderam e também nas que falharam ao tratamento. No entanto, após o tratamento  
15 com IFN  $\alpha$ -2b, observamos que pacientes com resposta satisfatória expressaram IFN- $\gamma$ , IL-  
16 2, TNF- $\alpha$  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  $\alpha$ -2b. A IL-4  
18 (Th2) estava expressa antes do tratamento com IFN  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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- $\beta$ 3 em paciente com falha terapêutica após o  
23 tratamento com IFN  $\alpha$ -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- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3, não foi possível correlacionar

1 os resultados com a resposta clínica ao tratamento com IFN  $\alpha$ -2b, uma vez que 1 paciente  
2 com resposta satisfatória apresentou expressão concomitante do TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 após o  
3 tratamento com IFN  $\alpha$ -2b, enquanto outras duas pacientes que não responderam ao  
4 tratamento expressaram TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3, após o tratamento com IFN  $\alpha$ -2b. Observamos  
5 também, que essas pacientes com falha terapêutica tiveram expressão concomitante de IL-  
6 12/TGF- $\beta$ 2 e IL-4/TGF- $\beta$ 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  $\alpha$ -2b.

12 **Conclusões:** O tratamento com IFN  $\alpha$ -2b intralesional nas pacientes com NIC  
13 de alto grau, obteve resposta clínica satisfatória em 60% das pacientes. A resposta imune  
14 Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) parece estar relacionada com a diminuição do grau da NIC, após  
15 o tratamento com IFN  $\alpha$ -2b nas pacientes com boa resposta. A expressão de TGF- $\beta$ , após  
16 o tratamento com IFN  $\alpha$ -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  $\alpha$ -2b.



*Abstract*

## 9. ABSTRACT

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

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

**Casuistry and Methods:** Study group was composed by 10 patients ranging from 18 to 50 years with a diagnosis of high-grade cervical intraepithelial neoplasia who did not underwent previous treatment. In this work it was used Intralesional Human recombinant Interferon  $\alpha$ -2b 3.000.000 U (Blauferon B<sup>R</sup>Blausiegel). Applications were done using a 1,0 ml syringe and 13 x 0,45 needle three times a week on alternate days (Mondays, Wednesdays and Fridays), for 6 consecutive weeks, resulting in 18 applications. Biopsy collection was done before the first application and after the 18th one of IFN  $\alpha$ -2b. For analyzing the RNAm expression of the cytokines it was used the PCR 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  $\alpha$ -2b we observed: lack of expression of cytokines  
11 Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12), before the treatment with IFN  $\alpha$ -2b in patients who  
12 answered and also in those who failed the treatment. However, after the treatment with IFN  
13  $\alpha$ -2b, we observed that responsive patients expressed IFN-  $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  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  $\alpha$ -2b. IL-4 (Th2) was expressed before the  
16 treatment with IFN  $\alpha$ -2b, in 2 responsive patients and also in 2 patients who failed the  
17 treatment. IL-4 expression, before the treatment with IFN  $\alpha$ -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- $\beta$ 3 in  
20 patient with therapeutical failure after the treatment with IFN  $\alpha$ -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- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3, it was not possible to correlate the results with the  
24 clinical response to the treatment with IFN  $\alpha$ -2b, since one responsive patient presented  
25 concomitant expression of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 after the treatment with IFN  $\alpha$ -2b, while

1 other two patients who did not answer to the treatment, expressed TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3  
2 after the treatment with IFN  $\alpha$ -2b. We also observed that these patients with therapeutical  
3 failure had concomitant expression of IL-12/TGF- $\beta$ 2 and IL-4/TGF- $\beta$ 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  $\alpha$ -2b.

10                   **Conclusions:** Treatment with Intralesional IFN  $\alpha$ -2b in patients with High-  
11 level CIN had satisfactory clinical response in 60% of the patients. Th1 immune response  
12 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) seems to be related to the decrease of the level of CIN, after the  
13 treatment with IFN  $\alpha$ -2b in responsive patients. TGF- $\beta$  expression after treatment with IFN  
14  $\alpha$ -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  $\alpha$ -2b.

# *Referências Bibliográficas*

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

- 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.  $\beta$ -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/](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.; PARANJAPPE, 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. Wieku. 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.; CORBELLA, 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 NOMELINI, 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.; NÚÑEZ-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.Virol.**, 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.; WILLIAMS, 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. Inteferons 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 TERVAHAUTA, 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.

*Anexo's*

## 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 Consubstanciado**  
**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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  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  $\gamma$ - 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-  $\alpha$ -2 $\beta$  intralesional.

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 significativo 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 Consubstanciado**  
**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  $\alpha$ -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 Obstetria, 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  $\alpha$ -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 imediato tratamento.

A medicação pode ocasionar alguns efeitos colaterais como:

febre, calafrios, mal esta 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 (0\*\*34)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 Consubstanciado**

**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  $\alpha$ -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 OBTÊ-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.fmtm.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  $\alpha$ -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 nº e laudo:** \_\_\_\_\_

**Biópsia nº 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 $\alpha$ -2b	Após o tratamento com IFN $\alpha$ -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  $\alpha$ -2b intralesional.**

	P (1)		P (2)		P (3)		P (4)		P (5)		P (6)		P (7)		P (8)		P (9)		P (10)	
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>																				
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>																				
<b>IL-2</b>																				
<b>IL-12</b>																				
<b>IL-4</b>																				
<b>IL-10</b>																				
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>																				
<b>TGF-<math>\beta</math>2</b>																				
<b>TGF-<math>\beta</math>3</b>																				
<b>Beta-actina</b>																				

**P (Paciente) e Número de identificação**

**I (Início do tratamento, antes da 1ª aplicação do IFN  $\alpha$ -2b)**

**F (Final do tratamento, após a 18ª aplicação do IFN  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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 compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro 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



**Blaufferon B<sup>R</sup>-Blausiegel (IPON)**



**Pipetas (IPON)**



**Termociclador (IPON)**

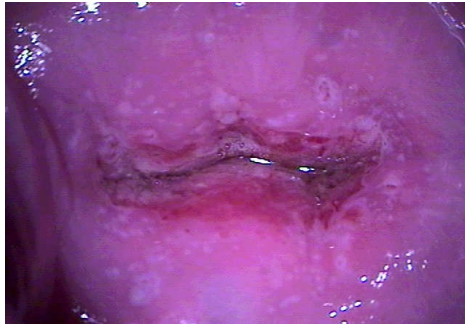


**Aparelho para Eletroforese (IPON)**



**Kit coletor para realização de Captura Híbrida (IPON)**

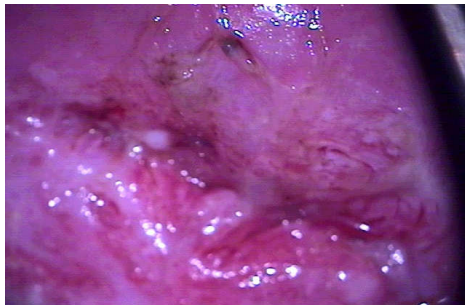
**ANEXO E: Imagens colposcópicas das lesões antes e após o tratamento**



**Paciente 1 Antes do Tratamento**



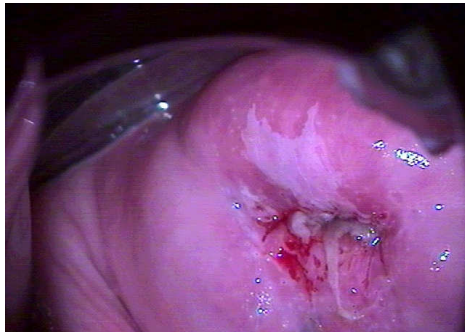
**Paciente 1 Após o Tratamento (Resposta)**



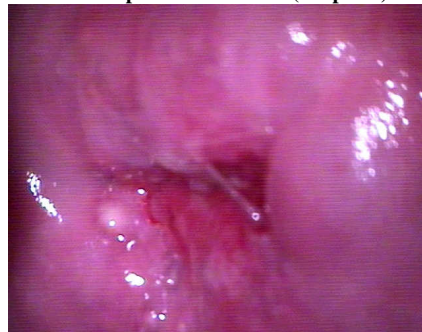
**Paciente 2 Antes do Tratamento**



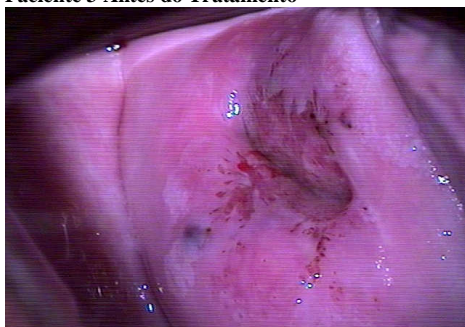
**Paciente 2 Após o Tratamento (Resposta)**



**Paciente 3 Antes do Tratamento**



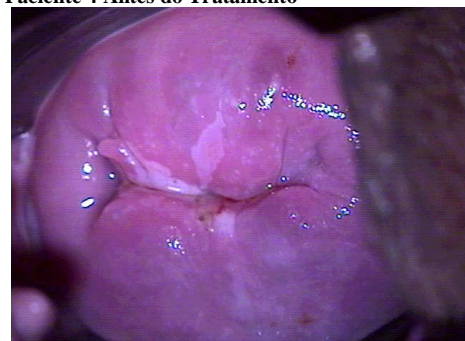
**Paciente 3 Após o Tratamento (Resposta)**



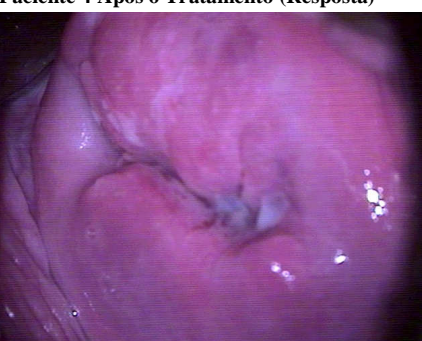
**Paciente 4 Antes do Tratamento**



**Paciente 4 Após o Tratamento (Resposta)**



**Paciente 5 Antes do Tratamento**

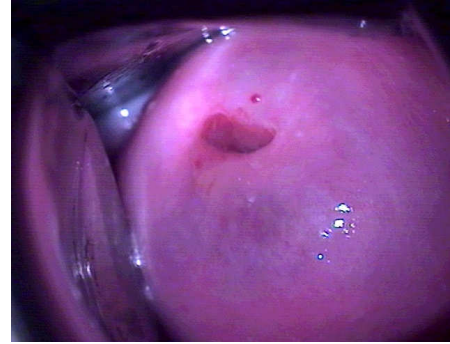


**Paciente 5 Após o Tratamento (Falha)**

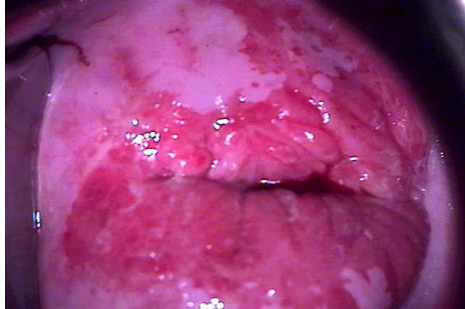




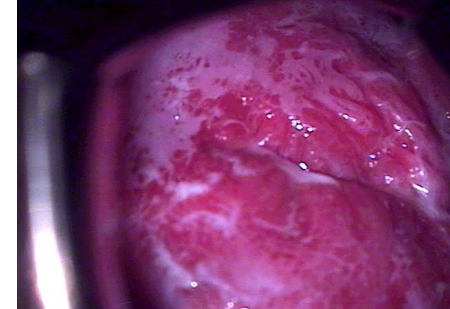
Paciente 6 Antes do Tratamento



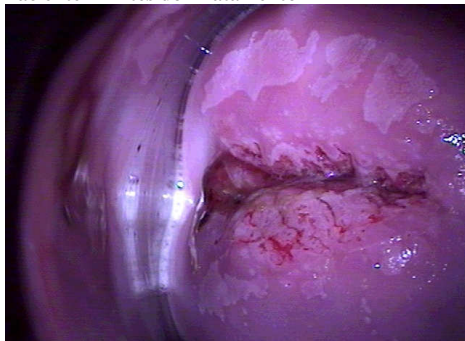
Paciente 6 Após o Tratamento (Resposta)



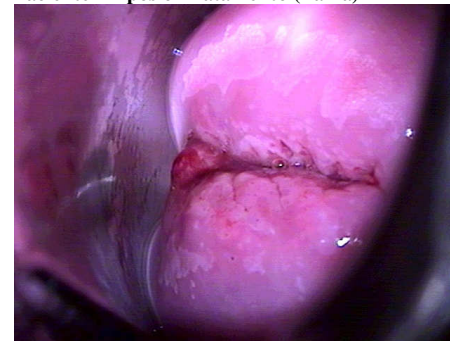
Paciente 7 Antes do Tratamento



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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -2b.4.IMUNOTERAPIA.I.Título.II.  
MURTA, EDDIE FERNANDO CANDIDO.

CDU 618.146:577.245