

***Elisa Lopes e Lages***

---

---

**Avaliação da resposta inflamatória em mulheres  
com lesões pré-invasoras e invasoras do colo  
uterino**

---

---

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia – área de concentração Tocoginecologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do Título de Mestre em Ginecologia

**Orientador: Prof. Dr. Agnaldo L. Silva Filho  
Co-orientadora: Profa. Dra. Andreza Vilaça Belo**

***Botucatu / São Paulo  
2010***

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
*BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus*

Lages, Elisa Lopes e.

Avaliação da resposta inflamatória em mulheres com lesões pré-invasoras e invasoras do colo uterino / Elisa Lopes e Lages. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu,  
Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Agnaldo Lopes da Silva Filho

Co-orientador: Andreza Vilaça Belo

Assunto CAPES: 40101150

1. Útero - Doenças - Estudo de caso    2. Resposta inflamatória

Palavras-chave: IFN- $\gamma$ ; Inflamação; MPO; NAG; Neoplasia do colo uterino;  
TNF- $\alpha$

*Dedicatória*

---

## **D**EDICO ESTA DISSERTAÇÃO...

*aos meus pais, Cristina e Marcos, e à minha irmã Alice, fontes  
constantes de amor, apoio, alegria e dedicação.*

---

*Agradecimentos*

---

*Ao Professor Agnaldo Lopes da Silva Filho, responsável por toda a minha trajetória acadêmica, pelo constante incentivo e orientação desse mestrado.*

*A Professora Andrezza Vilça Belo, pela ajuda nas dosagens laboratoriais e pela co-orientação na realização deste trabalho.*

*Aos professores do Departamento de Ginecologia, em especial ao Professor Paulo Traiman, pelos ensinamentos e ajuda.*

*À Professora Sílvia Passos Andrade, por ter-me gentilmente cedido o seu laboratório e por sua disponibilidade.*

*A todo o Laboratório de Angiogênese da UFMG, em especial à aluna Monaliza, pela ajuda nas dosagens laboratoriais.*

*Aos colaboradores do Setor de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp, Regina, Nathanael, Janete, Lillian, Andréa e Ana Cláudia, pela disponibilidade e preciosa ajuda.*

*A todas as pacientes que participaram deste projeto, pela confiança e contribuição para o desenvolvimento científico.*

*Aos amigos, em especial à companheira de mestrado, Sálua.*

*Ao Gustavo, meu companheiro e amigo de todas as horas.*

*A toda minha família, pela dedicação e estímulo na realização do mestrado.*

---

*Finalmente, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.*

---



*Epígrafe*

---

*“Feliz aquele que transfere o que sabe  
e aprende o que ensina”.*  
*Cora Coralina*

---

*Índice*

---

## Siglas

## Resumo

<b>1. Introdução .....</b>	<b>16</b>
1.1.Câncer de colo uterino .....	17
1.2.Inflamação .....	18
1.2.1 Inflamação aguda.....	19
1.2.2 Inflamação crônica .....	20
1.2.3 Inflamação e câncer .....	21
1.3 Marcadores da inflamação.....	25
1.3.1 N-Acetilglucosaminidase (NAG). .....	25
1.3.2 Mieloperoxidase (MPO).....	26
1.3.3 Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) .....	27
1.3.4 Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ).....	28
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>30</b>
2.1. Objetivo geral .....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
<b>3. Casuística e Métodos .....</b>	<b>32</b>
3.1 Casuística.....	33
3.1.1 - Critérios de Inclusão. ....	34
3.1.2 Critérios de exclusão .....	34
3.2 Métodos .....	35
3.2.1 Dosagens laboratoriais.....	36
3.2.1.1. Atividade de N- Acetilglicosaminidase (NAG).....	36
3.2.1.2. Atividade de Mieloperoxidase (MPO) .....	38
3.2.1.3. Dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ .....	40
3.2.2 - Análise Estatística.....	43
<b>4. Resultados .....</b>	<b>44</b>
4.1. Características gerais da amostra.....	45
4.2. Dosagens séricas de NAG, MPO, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ .....	47
4.3. Associação das dosagens séricas de NAG, MPO, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ com o grau das lesões pré-invasoras e estadiamento do CCE invasor do colo uterino.....	53
<b>5. Discussão .....</b>	<b>56</b>
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>63</b>
<b>7. Referências bibliográficas.....</b>	<b>65</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>74</b>
I. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa .....	75
II. Consentimento livre e esclarecido .....	76
<b>9. Summary .....</b>	<b>77</b>

*Siglas*

---

---

<b>CCE</b>	Carcinoma de células escamosas
<b>CEP</b>	Comitê de ética em pesquisa
<b>D.O.</b>	Densidade óptica
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>FIGO</b>	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Água oxigenada
<b>HPV</b>	Papilomavírus humano
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>NAG</b>	N-Acetilglucosaminidase
<b>NIC</b>	Neoplasia intra-epitelial cervical
<b>NK</b>	Natural-killer
<b>Nm</b>	Nanômetro
<b>nmol</b>	Nanomol
<b>Pg</b>	Picograma
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral-alfa
<b>ml</b>	Microlitro

---

*Resumo*

---

**Introdução:** A resposta inflamatória é um processo ativo nas neoplasias de colo do útero, podendo atuar tanto na progressão quanto na regressão da lesão. No local da inflamação estão presentes macrófagos e neutrófilos, além de citocinas como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ). Este estudo visa avaliar a resposta inflamatória sérica em mulheres com lesões pré-invasoras e invasoras do colo uterino.

**Métodos:** Foram analisadas amostras de soro obtidas de mulheres sem evidência de doença (n=30 – grupo controle), com lesões pré invasoras do colo uterino (NIC) (n=30) e com carcinoma invasor de colo uterino (CCE) (n=30). O sangue das pacientes foi coletado, centrifugado e armazenado até análise laboratorial. A atividade das enzimas inflamatórias N-acetilglucosaminidase (NAG) e mieloperoxidase (MPO) foram obtidas por ensaio enzimático. Utilizou-se o método imunoenzimático de ELISA para obtenção dos níveis séricos do TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado, Kruskal-Wallis ou Mann Whitney. A correlação entre os grupos foi realizada pelo teste Kendall's Tau. As diferenças com valor de  $p < 0,05$  foram consideradas significativas.

**Resultados:** No grupo de pacientes com lesões pré- invasoras do colo uterino, duas mulheres apresentavam NIC I (6,7%), oito pacientes NIC II (26,7%) e 20 casos apresentavam NIC III (66,7%). O estadiamento (FIGO) das pacientes com CCE invasor foi IA2 em três casos (10,0%), IB1 em 19 (63,3%), IB2 em dois (6,7%) e IIA em seis (20,0%) mulheres pertencentes a esse grupo. As atividades das enzimas NAG, MPO e níveis de TNF- $\alpha$  foram maiores no grupo de mulheres com NIC, quando comparado com o grupo com CCE. Os níveis de IFN- $\gamma$  foram menores no grupo de mulheres com NIC, quando comparado com o grupo com CCE. Não houve uma associação significativa entre o grau do NIC e o estadiamento do CCE invasor do colo uterino com a inflamação avaliada pelos níveis dos marcadores inflamatórios estudados.

**Conclusão:** A progressão do processo de carcinogênese nas neoplasias de colo uterino associou-se com uma diminuição da resposta inflamatória sérica.

**Palavras-chave:** Neoplasia do colo uterino, Inflamação, NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

---



# *1. Introdução*

---

## **1.1 Câncer de colo uterino**

O câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais freqüente entre as mulheres, com aproximadamente 500 mil casos novos por ano no mundo, sendo responsável pelo óbito de, aproximadamente, 230 mil mulheres por ano. Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos quando comparada aos países mais desenvolvidos [1].

A incidência de câncer do colo do útero evidencia-se na faixa etária de 20 a 29 anos, e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos. Ao mesmo tempo, com exceção do câncer de pele, é o câncer que apresenta maior potencial de prevenção e cura quando diagnosticado precocemente. Em países desenvolvidos, a sobrevida média, estimada em cinco anos, varia de 51% a 66%. Nos países em desenvolvimento, os casos são encontrados em estádios relativamente avançados e, conseqüentemente, a sobrevida média é menor, cerca de 41% após cinco anos. A média mundial estimada é de 49%. O número de casos novos de câncer do colo do útero esperado para o Brasil no ano de 2010 será de 18.430, com um risco estimado de 18 casos a cada 100 mil mulheres [1].

O papiloma vírus humano (HPV) exerce um papel central na carcinogênese do colo uterino, relacionando-se tanto à Neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) quanto ao carcinoma invasor. Outros fatores relacionam-se com o vírus, de forma a potencializar sua ação na célula hospedeira e facilitar o desenvolvimento dos processos de imortalização e carcinogênese [2, 3].

---

## 1.2 Inflamação

A inflamação é uma reação complexa que consiste em respostas vasculares, celulares (migração e ativação de leucócitos) e reações sistêmicas. Os tecidos, células e outros componentes envolvidos na inflamação incluem o fluido e as proteínas do plasma; as células circulantes, como neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas; os vasos sanguíneos e os componentes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo como os mastócitos, fibroblastos, macrófagos, linfócitos, proteínas fibrosas estruturais, glicoproteínas de adesão e proteoglicanos [4].

Esta resposta imunitária no local da lesão pode ser do tipo Th1, que inclui as citocinas imuno-estimulantes interleucina-2 (IL-2), o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), que induzem principalmente imunidade celular; ou do tipo Th2 onde estão presentes as interleucinas: IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 que são inibidoras da resposta imune mediada por células e predominantemente induzem resposta humoral [5, 6].

A resposta inflamatória pode ser desencadeada por diversos agentes lesivos, como: microorganismos, queimaduras, traumas físicos ou células tumorais [7]. O processo inflamatório pode ser classificada em inflamação aguda ou crônica de acordo com as características morfológicas observadas [4].

---

### 1.2.1 Inflamação aguda

A fase aguda da inflamação tem curta duração e caracteriza-se por alteração da permeabilidade vascular com exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas, liberação de mediadores inflamatórios e leucócitos polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos, para o sítio da lesão. Os principais fatores responsáveis pela quimiotaxia neutrofílica são a fração 5a do complemento, interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e o TNF-  $\alpha$ . Esse tipo celular é responsável pela resposta fagocítica rápida e não específica e pela ação destrutiva de seus conteúdos granulares [8].

Caso os leucócitos envolvidos nessa etapa do processo inflamatório consigam extinguir o estímulo, ocorrerá o reparo tissular. A persistência do estímulo inflamatório implica recrutamento contínuo e ativação de células mononucleares, estabelecendo-se uma inflamação crônica. A ativação contínua de células mononucleares provoca um aumento de produção e secreção de citocinas inflamatórias, as quais amplificam e perpetuam a resposta à lesão [9].

---

### 1.2.2 Inflamação crônica

A inflamação crônica está associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, necrose tissular, e fibrose. A inflamação termina quando o estímulo é eliminado e os mediadores secretados são destruídos ou dispersos. Existem também mecanismos antiinflamatórios ativos que modulam a resposta e evitam que ela seja exacerbada [4].

O macrófago é a figura central da inflamação crônica devido ao grande número de substâncias biologicamente ativas que produz, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. O acúmulo de macrófagos durante a resposta inflamatória ocorre pelo recrutamento de monócitos da circulação. Sua ativação, feita principalmente pelo IFN- $\gamma$ , resulta na liberação de fatores quimiotáticos direcionados a vários tipos de células, ou na produção de substâncias tóxicas para os tecidos envolvidos no processo inflamatório, ou ainda na proliferação de fibroblastos com deposição de colágeno, levando ao reparo tecidual [10, 11]. Outros tipos celulares presentes na inflamação crônica são os linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, mastócitos e neutrófilos, apesar desses últimos serem os tipos celulares característico de um processo inflamatório agudo [12].

---

### 1.2.3 Inflamação e câncer

As neoplasias têm como componentes básicos o parênquima, constituído pelas células tumorais e o estroma, composto principalmente de vasos neoformados, células inflamatórias (principalmente macrófagos e linfócitos) e de tecido conjuntivo (células e matriz extracelular). As células parenquimatosas determinam o comportamento, as consequências patológicas, o crescimento e a evolução do tumor. Entretanto, o tumor é criticamente dependente de seu estroma [4, 13].

Nos tumores malignos, as células predominantemente encontradas no estroma são macrófagos, linfócitos, células endoteliais e fibroblastos; em alguns tipos tumorais também há eosinófilos, granulócitos, células natural-killer (NK) e linfócitos B. O número e o tipo de células que constituem o infiltrado inflamatório nos tumores sólidos estão relacionados com a produção local de citocinas e quimiocinas pelas células do tumor e do estroma. [14-16].

A presença de células inflamatórias nas neoplasias é vista, por alguns pesquisadores, como uma reação do organismo tentando controlar o crescimento desse tecido. Entretanto, a resposta inflamatória produzida pela presença de células tumorais é importante para o desenvolvimento neoplásico. Vários estudos têm mostrado a relação entre o influxo de células inflamatórias e o desenvolvimento tumoral [14-16].

Dentre as células infiltradas no estroma tumoral, os macrófagos merecem destaque. Essas células apresentam capacidade de afetar o desenvolvimento

---

do tumor de diferentes formas. Elas apresentam funções antagônicas, pois são capazes de lizar, atividade citotóxica, preferencialmente células tumorais e não as células normais; mas, podem induzir neovascularização, alterando, desta forma, a velocidade de crescimento tumoral e a formação de metástase [17]. Os macrófagos produzem grande quantidade de fatores de crescimento pró e antiangiogênicos, enzimas proteolíticas e citocinas; também apresentam atividade pró-coagulante que, indiretamente, contribui para a formação vascular [18]. Na resposta imune contra o HPV, tanto local quanto sistemicamente, o ambiente pode tornar-se favorável à transformação de neoplasias, o que permite a progressão de NIC para o carcinoma cervical [19]. Assim como os macrófagos, porém em menor proporção, encontram-se infiltrados de neutrófilos no estroma tumoral, atuando como fator importante no desenvolvimento do carcinoma do colo uterino [20]. Sabe-se que no infiltrado de células tumorais, macrófagos e neutrófilos desenvolvem papel importante na progressão e disseminação de vários tipos de tumores [17, 21].

Em vários tipos de neoplasias, é gerado um microambiente tumoral devido à repressão ou à expressão de diferentes genes de citocinas e quimiocinas importantes na resposta imune e de células tumorais. Citocinas imunossupressoras são produzidas no local do tumor, o que favorece a progressão do processo neoplásico. É difícil determinar a participação de uma citocina isolada na progressão do câncer. Isso se deve à interação com outras citocinas, fatores de crescimento e hormônios, que atuam simultaneamente no local do tumor, assim como os leucócitos [22].

---

Existem dois mecanismos que podem explicar a participação das citocinas no desenvolvimento de câncer. É possível que as citocinas favoreçam o desenvolvimento tumoral ao interagir com fatores de proliferação tumoral, induzir a atividade de angiogênese tumoral, e promover a metástase, pelo aumento da adesão celular. E as citocinas podem agir como mediadores da resposta imune, inibindo a expressão de moléculas e receptores, tanto das células da resposta imune como das células tumorais, que estão envolvidos na identificação e destruição de células tumorais [23].

O TNF- $\alpha$ , quando expresso localmente, possui efeito terapêutico, mas quando sua expressão é desregulada e este é secretado na circulação sanguínea, pode mediar uma série de doenças, incluindo o câncer [24]. Este pode também ser produzido por células tumorais, fazendo o papel de um promotor tumoral endógeno. A ação do TNF- $\alpha$  foi relacionada a todas as etapas da carcinogênese, incluindo transformação celular, promoção, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e metástase [25].

O câncer de colo uterino resulta de uma deficiência no controle celular da expressão dos genes do HPV, e o controle normal é mediado por fatores liberados por macrófagos. A presença de lesões malignas e pré-malignas em nível tissular pode originar uma infiltração de células do sistema imune, juntamente com as células do próprio tecido, iniciando uma resposta ao processo de infecção do HPV. Estes tipos celulares podem estar representados principalmente por linfócitos e monócitos/macrófagos [5]. A regressão das lesões do colo está associada a uma resposta imune mediada por citocinas do

---



tipo Th1, caracterizada por um massivo infiltrado de células mononucleares, regulação positiva de moléculas de adesão, e apoptose de queratinócitos infectados, sugerindo que este perfil de resposta imune tem um importante papel na defesa do hospedeiro [26].

### 1.3 Marcadores da inflamação

#### 1.3.1 N-Acetilglucosaminidase (NAG)

A N-Acetilglucosaminidase (NAG) é uma enzima lisossômica intracelular liberada por macrófagos ativados durante o processo de fagocitose, lise celular ou dano tecidual [27, 28]. A ação dessa enzima baseia-se na hidrólise do  $p$ -nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosamina (substrato) pela N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase liberando  $p$ -nitrofenol [29].

A detecção da atividade do NAG em fluidos biológicos, juntamente com os níveis de cito/quimiocinas inflamatórias, pode ser utilizada como marcador indireto do acúmulo de macrófagos ativados e da resposta inflamatória [27, 28].

---

### 1.3.2 Mieloperoxidase (MPO)

A peroxidase é uma enzima, hemoproteína, encontrada em leucócitos polimorfonucleares. Os neutrófilos possuem grandes quantidades de peroxidase, que diferem com relação a outros tipos em estrutura, atividade bioquímica, imunologicamente, geneticamente e espectrofotometricamente, sendo denominada mieloperoxidase (MPO) [30, 31]. A mieloperoxidase é tradicionalmente vista como uma enzima microbicida catalizando a formação de hipoclorito a partir de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e cloreto [32, 33]. Esta enzima é encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos e secretada durante a ativação dessas células [27, 28]. Devido a essa característica, tem sido usada com sucesso como um marcador bioquímico de recrutamento destas células [34, 35]. Possui potente propriedade pró-inflamatória e pode contribuir diretamente com a lesão tecidual. Pode também ser minimamente expressada por monócitos e macrófagos [27, 28]. Os neutrófilos secretam três vezes mais MPO que os mononucleares, representando a fonte celular intravascular mais freqüente da MPO e contribuem com 95% do seu conteúdo total circulante [27, 28] [36].

A dosagem de MPO associa-se com a quantidade de neutrófilos recrutados na lesão durante a inflamação, sendo considerada um importante marcador quantitativo indireto de neutrófilos e representa um modelo potencial para diagnóstico e intervenções terapêuticas nas doenças vasculares e inflamatórias em geral [37].

---

### 1.3.3 Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ )

O TNF- $\alpha$  é uma citocina biossintetizada principalmente por monócitos e macrófagos ativados. Mas também é produzido e secretado em menor quantidade por neutrófilos, células natural killers (NK), células endoteliais, mastócitos e algumas células tumorais [38, 39].

O TNF- $\alpha$  é um dos principais mediadores das reações inflamatórias, imunológicas, e patofisiológicas [40]. Essa citocina induz imunidade anti-tumoral através de efeitos citotóxicos diretos sobre as células cancerosas e pela estimulação da resposta imune anti-tumor. Ela também interage com as células endoteliais, induzindo a expressão de moléculas de adesão intercelular, moléculas de adesão da célula vascular e E-selectina, permitindo desta forma o acesso dos granulócitos ao local da inflamação. O TNF- $\alpha$  é um potente ativador de neutrófilos, mediando a aderência, quimiotaxia, degranulação e a explosão respiratória. É responsável pela caquexia observada em infecções crônicas e no câncer [38, 41].

O papel do TNF- $\alpha$  na inflamação aguda ilustra como o mesmo atua nas mudanças celulares e na dinâmica recomposição tecidual. Atuando durante um processo infeccioso, vários tipos de células são recrutados até o sítio inflamatório, e quando o processo infeccioso é contido, é essencial que a homeostasia tecidual normal seja restabelecida [42].

---

#### 1.3.4 Interferon-gama (IFN- $\gamma$ )

O IFN- $\gamma$  é uma citocina produzida principalmente por células T e grandes linfócitos granulares [43-45]. É o principal fator de ativação de macrófagos na circulação, ativando numerosas funções, incluindo a citotoxicidade a tumores, atividade antimicrobiana, aumenta o potencial microbicida contra patógenos intracelulares e estimula a apresentação de antígenos aos linfócitos através da indução de moléculas MHC de classe II [46].

Pelo seu papel crítico na estimulação ou ativação da expressão gênica, diferenciação e função de monócitos/macrófagos, seus efeitos, juntamente com a importância de monócitos/macrófagos como fontes de IL-12 (potente indutor de IFN- $\gamma$ ), demonstram o papel crítico que a população de linfócitos tem na regulação da resposta imune [47].

---

A resposta inflamatória está presente nas neoplasias de colo uterino, podendo atuar na manutenção, progressão ou regressão tumoral. No infiltrado peritumoral são evidenciados macrófagos e neutrófilos, além de citocinas como o TNF- $\alpha$ , produzido por macrófagos e ativador de neutrófilos e o IFN- $\gamma$ , ativador de macrófagos. Dessa forma, por participarem de importantes etapas do processo de inflamação, esse estudo visa avaliar as dosagens séricas de NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  em mulheres com lesões pré-invasoras e invasoras do colo uterino. O estudo desses marcadores de inflamação pode propiciar uma melhor compreensão do processo de carcinogênese do carcinoma invasor do colo do útero.

---

## *2. Objetivos*

---

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a resposta inflamatória, por meio das dosagens séricas de NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , em mulheres com lesões pré-invasoras e invasoras do colo uterino.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Comparar a resposta inflamatória sérica entre as mulheres do grupo controle, portadoras de NIC e com carcinoma de células escamosas (CCE) invasor do colo uterino.
  2. Avaliar a associação das dosagens séricas de marcadores inflamatórios com o grau das lesões pré-invasoras e estadiamento do CCE invasor do colo uterino.
-



### *3. Casuística e Métodos*

---

### **3.1 Casuística**

O estudo foi realizado prospectivamente em 90 mulheres, atendidas no Hospital das Clínicas da UFMG e no Hospital Mário Pena, no período de setembro de 2008 a setembro de 2009. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG parecer número ETIC 326/08 (anexo I).

As pacientes foram divididas em 3 grupos:

**Grupo 1** – 30 mulheres sem evidências de qualquer doença (grupo controle).

**Grupo 2** – 30 mulheres com diagnóstico de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC).

**Grupo 3** – 30 mulheres com diagnóstico de CCE invasor do colo uterino.

---

### **3.1.1 - Critérios de Inclusão**

- ✓ Mulheres com diagnóstico de carcinoma invasor do colo uterino com proposta de tratamento cirúrgico, radio e/ou quimioterápico (casos).
- ✓ Mulheres com diagnóstico de lesões pré-invasoras do colo uterino e proposta de conização (casos)
- ✓ Mulheres submetidas a exame de rotina, sem evidências de qualquer doença (controle).
- ✓ Termo de consentimento livre e esclarecido assinado (anexo II).

### **3.1.2 Critérios de exclusão**

- ✓ Pacientes previamente tratadas por quimio e/ou radioterapia.
  - ✓ Evidência a laparotomia de algum processo infeccioso agudo peritoneal.
  - ✓ Pacientes com historia de uso de imunossupressores, corticosteróides e/ou antiinflamatórios não esteróides ha pelo menos 3 meses.
  - ✓ Não concordância em participar do estudo.
-

### **3.2 Métodos**

Foram coletadas amostras de 10 ml de sangue periférico das mulheres no pré-operatório ou exame de rotina. O sangue foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro e estocado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das dosagens laboratoriais.

---

### **3.2.1 Dosagens laboratoriais**

#### **3.2.1.1. Atividade de N- Acetilglicosaminidase (NAG)**

Para realização da dosagem da NAG, foram utilizadas 100µl das amostras de soro que foram colocados em duplicata a uma placa de 96 poços. Nesses poços foram adicionados 100µl do substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida) (Sigma - Aldrich), diluído em tampão citrato/fosfato com pH = 4,5. A seguir, foram incubadas a 37° C durante 10 minutos. Por último, foram adicionados 100µl de tampão glicina 0,2M, pH = 10,6 (Figura 3.1). A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de Elisa (Thermoplate 3200 <sup>TM</sup>) com comprimento de onda de 400 nm. Os resultados foram expressos em atividade de NAG (Absorbância em DO 400 nm/ml de cada amostra).

---

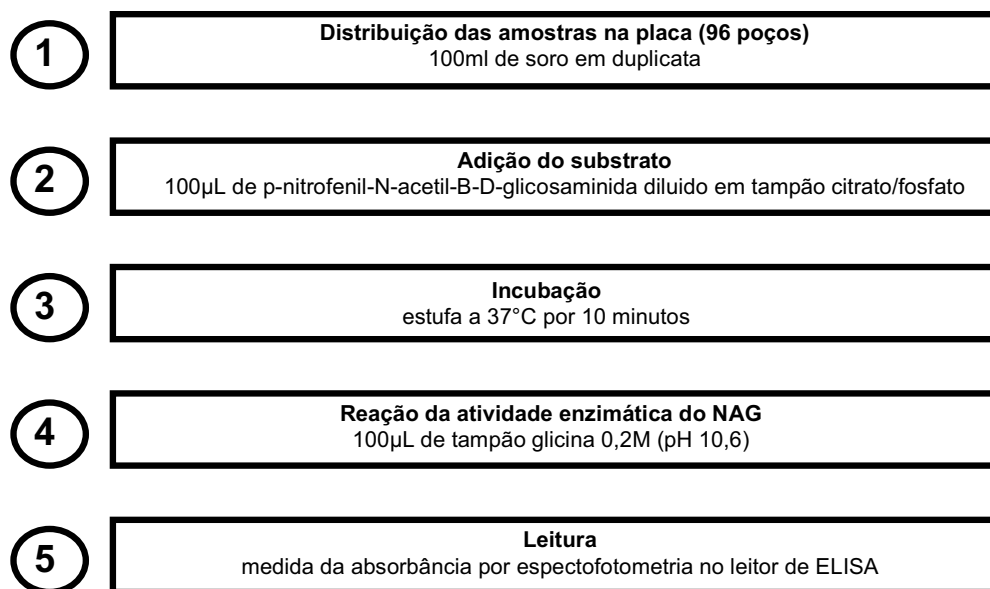


Figura 3.1

Fluxograma do protocolo básico da técnica de ensaio enzimático para detecção da atividade de NAG.

Nota: NAG -N- Acetilglicosaminidase.

#### 3.2.1.2. Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

Para a dosagem da atividade do MPO foram utilizadas amostras de soro diluídas em tampão fosfato com pH 5,4 nas concentrações de 1:3 e 1:1, respectivamente. Em seguida foi colocado 25µl das amostras em duplicata a uma placa de 96 poços. Às amostras, adicionaram-se 25µl do substrato TMB (3,3', 5,5' – tetrametilbenzidina – Sigma - Aldrich) diluído em DMSO (Dimetil sulfóxido – Merck) e procedeu-se à incubação da placa a 37° C por 5 minutos. Após esse período, foi acrescentado 100µl de peróxido de hidrogênio 0,003% a cada poço e a placa foi novamente incubada a 37° C por 5 minutos. A reação foi interrompida através da adição de 100µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4M (Figura 3.2). A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 450 nm pelo aparelho Thermoplate 3200 <sup>TM</sup>. Os resultados foram expressos em atividade de MPO (Absorbância em DO 450 nm /ml das amostras).

---

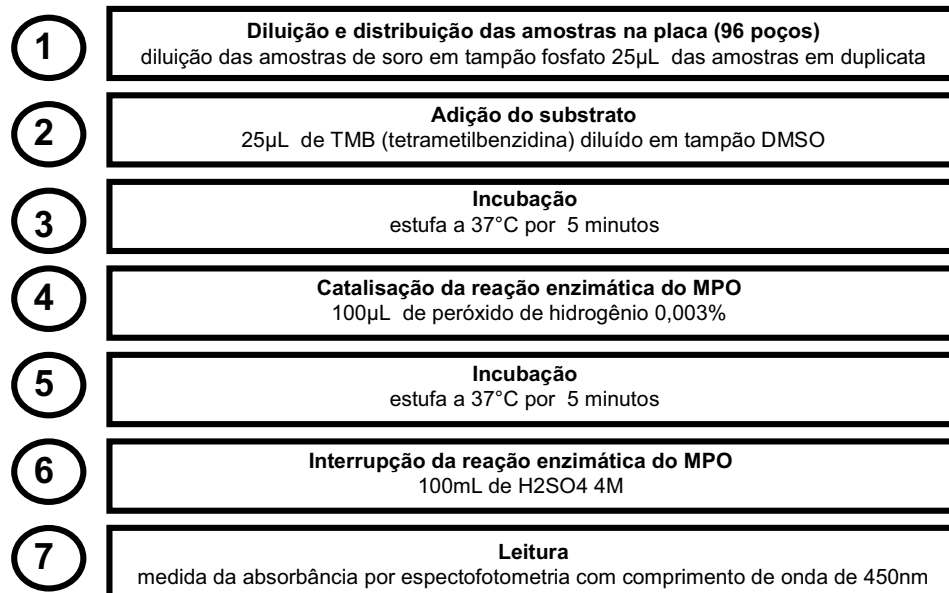


Figura 3.2

Fluxograma do protocolo básico da técnica de ensaio enzimático para detecção da atividade de MPO.

Nota: DMSO - Dimetilsulfóxido; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Ácido sulfúrico; MPO - Mieloperoxidase.

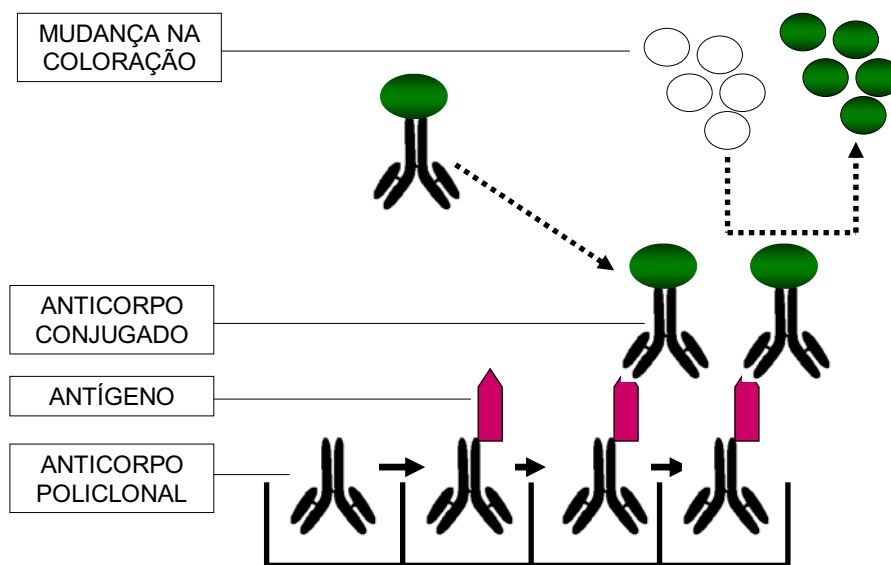


### 3.2.1.3. Dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ .

As citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  foram avaliadas pela técnica de ELISA utilizando kits R&D Systems (Minneapolis – EUA).

O ensaio imunoenzimático foi realizado seguindo-se os passos do protocolo padronizado pelo fornecedor do kit. A placa de 96 poços “virgem” foi fixada com anticorpo policlonal. Lavou-se cada poço da placa com 200  $\mu$ l de solução tampão-ensaio, agitando-se a placa por 10 minutos à temperatura ambiente. Removeu-se toda essa solução e acrescentou-se 25  $\mu$ l de solução tampão-ensaio aos poços classificados como “brancos”, como curva padrão e aos locais destinados às amostras. Uma fração de 25  $\mu$ l de cada amostra foi adicionada aos poços apropriados, permitindo que os anticorpos específicos fossem ligados aos antígenos. Acrescentou-se às amostras meio próprio para lavagem dos anticorpos e a placa foi incubada por uma hora à temperatura ambiente. Lavou-se a placa duas vezes com 200  $\mu$ l de solução de lavagem, com a finalidade de retirar os anticorpos não ligados. Adicionou-se aos poços 25  $\mu$ l de solução para detecção do anticorpo e 25  $\mu$ l de estreptavidina e a placa foi novamente incubada por trinta minutos à temperatura ambiente. Lavou-se a placa duas vezes com 200  $\mu$ l de solução de lavagem para retirar os conjugados não ligados. Foram então adicionados 100  $\mu$ l do substrato cromogênico para detectar a presença da ligação antígeno anticorpo (Figuras 3.3 e 3.4). A placa foi encaminhada ao aparelho de leitura de ELISA.

---



**Figura 3.3**

Representação esquemática da técnica de ELISA utilizada para avaliação das citocinas TNF-  $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

Nota: ELISA - *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*; TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral-alfa) e IFN- $\gamma$  (interferon-gama).

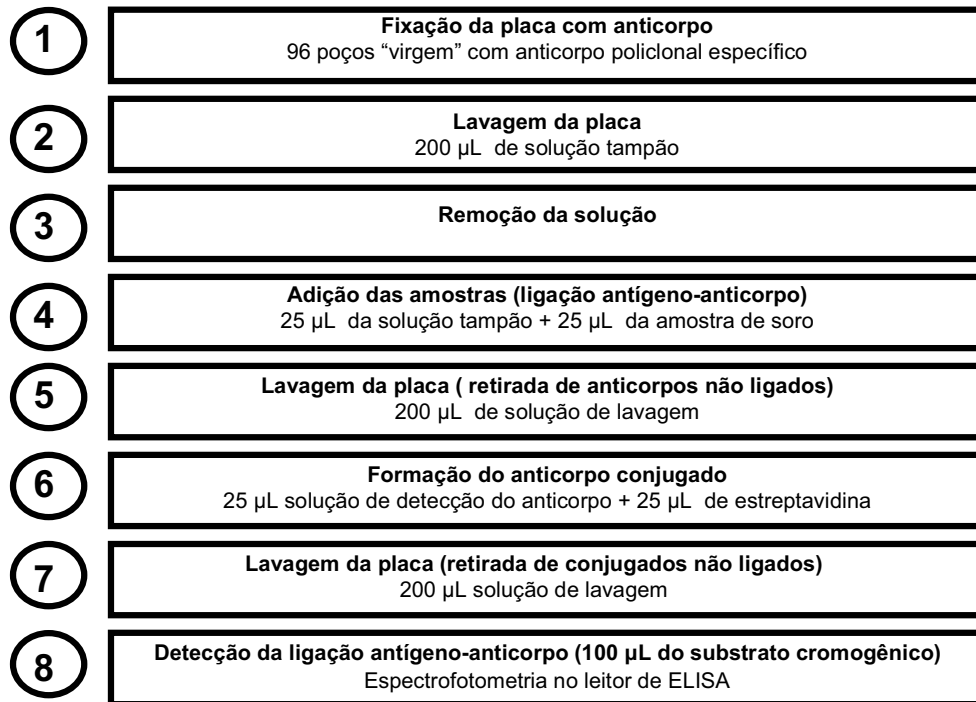


Figura 3.4

Fluxograma do protocolo básico de ELISA para detecção das citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

Nota: ELISA - *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*; TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral-alfa) e IFN- $\gamma$  (interferon-gama).

### **3.2.2 - Análise Estatística**

As informações foram codificadas e digitadas em banco de dados no programa SPSS para Windows versão 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), que desenvolveu os cálculos posteriores.

Foi avaliado o pressuposto de normalidade e, com este objetivo, aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov que indicou que a distribuição das dosagens séricas dos marcadores avaliados não segue a normalidade ( $p < 0,001$ ). Portanto, nesta análise foram empregados testes não paramétricos, que são mais robustos à violação deste pressuposto.

As variáveis foram descritas por meio de suas medianas e intervalos interquartis. As diferenças entre os grupos foi avaliada pelo teste do qui-quadrado, Kruskal-Wallis ou Mann Whitney conforme indicados. A correlação entre os grupos foi realizada pelo teste Kendall's Tau. As diferenças ou correlações com valor de  $p < 0,05$  foram consideradas significativas.

---

## 4. Resultados

---

#### 4.1. Características gerais da amostra

As pacientes incluídas neste estudo apresentaram idade média  $\pm$  de 47,3 com erro padrão de  $\pm 1,1$  anos e variação entre 30 e 79 anos. A paridade média foi de  $2,3 \pm 0,1$  partos com variação entre 0 e 6 partos. No grupo de pacientes com CCE observou-se uma idade mais avançada e um número maior de pacientes que estavam na pós-menopausa em comparação àquelas portadoras de NIC e ao grupo controle ( $p = 0,001$  e  $p = 0,016$ ; respectivamente) (Tabela 4.1). Os grupos estudados não apresentavam diferenças em relação à paridade ( $p = 0,230$ ) e tabagismo ( $p = 0,749$ ).

No grupo de pacientes com lesões pré-invasoras do colo uterino, duas mulheres apresentavam NIC I (6,7%), oito pacientes NIC II (26,7%) e 20 casos apresentavam NIC III (66,7%). O estadiamento (FIGO) das pacientes com CCE invasor foi IA2 em três casos (10,0%), IB1 em 19 (63,3%), IB2 em dois (6,7%) e IIA em seis mulheres pertencentes a esse grupo (20,0%).

---

Tabela 4.1: Comparação das características gerais da amostra.

	Controle	NIC	CCE	P
	(n= 30)	(n=30)	(n=30)	
Idade	45,5	42,0	51,0	0,001
(anos)	(39,2-50,0)	(37,0-46,0)	(44,8-57,0)	
Paridade	2,0	2,0	3,0	0,230
(partos)	(2,0-3,0)	(1,0-3,0)	(2,0-3,0)	
Menopausa				0,016
Não	22 (73,3%)	26 (86,7%)	16 (53,3%)	
Sim	8 (26,7%)	4 (13,3%)	14 ( 46,7%)	
Tabagismo				0,749
Não	26 (86,7%)	25 (83,3%)	27 (90,0%)	
Sim	4 (13,3%)	5 (16,7%)	3 (10,0%)	

**Nota:** NIC: Neoplasia intra-epitelial cervical. CCE: Carcinoma de células escamosas.

Os valores representam a mediana e intervalo interquartil ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) ou n (porcentagem). A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de do qui-quadrado ou Mann-Whitney.

#### 4.2. Dosagens séricas de NAG, MPO, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$

Houve uma diferença significativa das dosagens séricas de NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  entre os grupos estudados (Tabelas 4.2 e 4.3). A atividade sérica de NAG foi superior no grupo controle, em comparação com o grupo de mulheres com NIC, que foi superior àquelas com CCE invasor do colo uterino ( $p < 0,001$  e  $p = 0,002$ ; respectivamente). As mulheres com CCE invasor do colo uterino apresentaram uma atividade sérica de MPO inferior àquelas com NIC e grupo controle ( $p = 0,002$  e  $p = 0,011$ ; respectivamente). As dosagens séricas de TNF- $\alpha$  foram superiores nas pacientes com NIC em comparação àquelas com CCE invasor ( $p = 0,003$ ). As pacientes com NIC apresentaram dosagens séricas de IFN- $\gamma$  inferiores àquelas com neoplasia invasora ( $p = 0,026$ ).

Conforme ilustra a Tabela 4.3, as dosagens séricas de NAG apresentaram uma diminuição progressiva com o processo de instalação de uma neoplasia invasora do colo uterino. As dosagens de MPO e TNF- $\alpha$  também seguiram esse padrão de diminuição dos níveis séricos no CCE invasor em comparação àquelas mulheres com NIC. Ao contrário, os níveis séricos de IFN- $\gamma$  foram superiores nas mulheres com neoplasia invasora em comparação àquelas com lesões pré-invasoras do colo uterino.

Considerando-se os grupos de mulheres com NIC e CCE invasor do colo uterino, houve uma correlação positiva dos níveis séricos de NAG com as dosagens de TNF- $\alpha$  ( $\tau = 0,587$ ;  $p = 0,049$ ) (Figura 4.1A). Os níveis séricos de INF-

---



gama se correlacionaram negativamente com as dosagens de NAG ( $\tau=-0,272$ ;  $p=0,005$ ) e TNF- $\alpha$  ( $\tau=-0,223$ ;  $p=0,030$ ) (Figura 4.1 B e C).

Como mostra a figura 4.1 houve uma associação significativa da dosagem sérica do NAG, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Quanto maior a atividade de NAG, maiores são os níveis de TNF- $\alpha$  ( $p= 0,049$ ); quanto maior a atividade de NAG, menores os níveis de IFN- $\gamma$  ( $p= 0,005$ ) e quanto maiores os níveis de TNF- $\alpha$ , menores os níveis de IFN- $\gamma$  ( $p= .0,030$ ).

---

**Tabela 4.2:** Comparação das dosagens séricas de NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no grupo controle, em mulheres com NIC e CCE invasor.

	Controle (n=30)	NIC (n=30)	CCE (n=30)	P
NAG (nmol/mL)	126,0 (97,0 - 151,0)	84,9 (64,4 - 103,2)	71,6 (54,3 - 78,2)	< 0,001
MPO (D.O.450nm/mL)	10,1 (8,4 – 11,0)	10,0 (8,7 - 10,9)	8,4 (7,3 - 9,3)	0,006
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	27,2 (24,6 – 28,0)	31,0 (29,2 - 35,0)	27,0 (24,4 - 32,2)	< 0,001
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	0,15 (0,14 – 0,16)	0,13 (0,11 – 0,14)	0,14 (0,12 – 0,16)	< 0,001

**Nota:** NIC: Neoplasia intraepitelial cervical. CCE: Carcinoma de células escamosas. NAG: N-Acetilglucosaminidase; MPO: Mieloperoxidase; TNF-  $\alpha$ : Fator de necrose tumoral-alfa; IFN- $\gamma$ : Interferon-gama.

Os valores foram expressos em medianas e intervalos interquartis (P25-75). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Kuskall Wallis (3 grupos ) ou Mann Whitney (2 grupos):

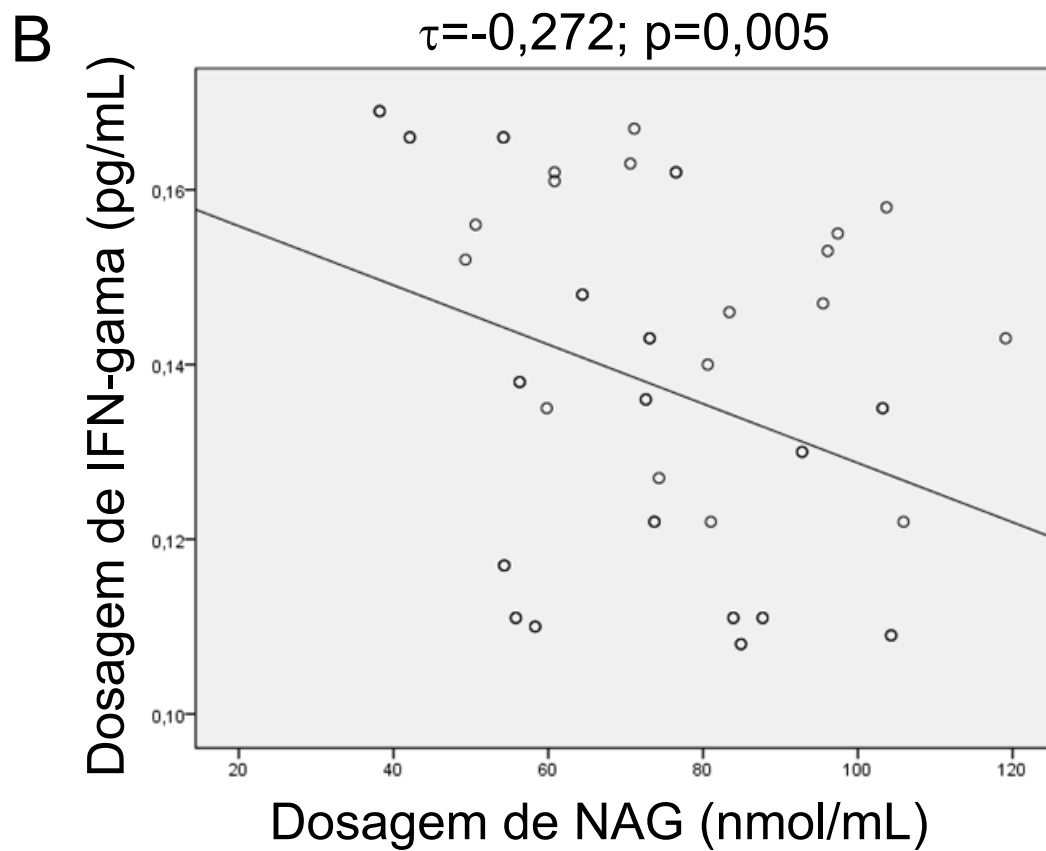
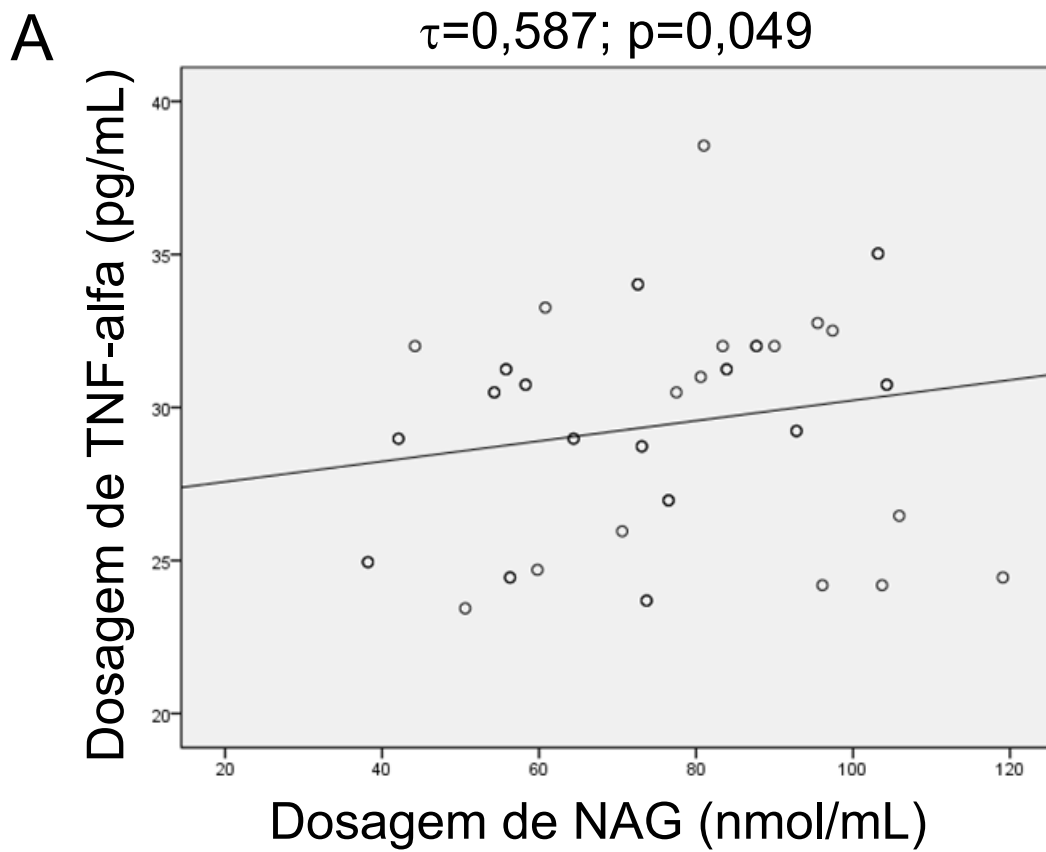
NAG- Controle vs. NIC:  $p = <0,001$ ; Controle vs. CCE:  $p = <0,001$ ; NIC vs. CCE:  $p = 0,002$ ;  
MPO - Controle vs. NIC:  $p = 0,756$ ; Controle vs. CCE:  $p = 0,011$ ; NIC vs. CCE:  $p = 0,002$ ;  
TNF-  $\alpha$  - Controle vs. NIC:  $p = <0,001$ ; Controle vs. CCE:  $p = 0,092$ ; NIC vs. CCE:  $p = 0,003$ ;  
IFN- $\gamma$  - Controle vs. NIC:  $p = <0,001$ ; Controle vs. CCE:  $p = 0,066$ ; NIC vs. CCE:  $p = 0,026$ .

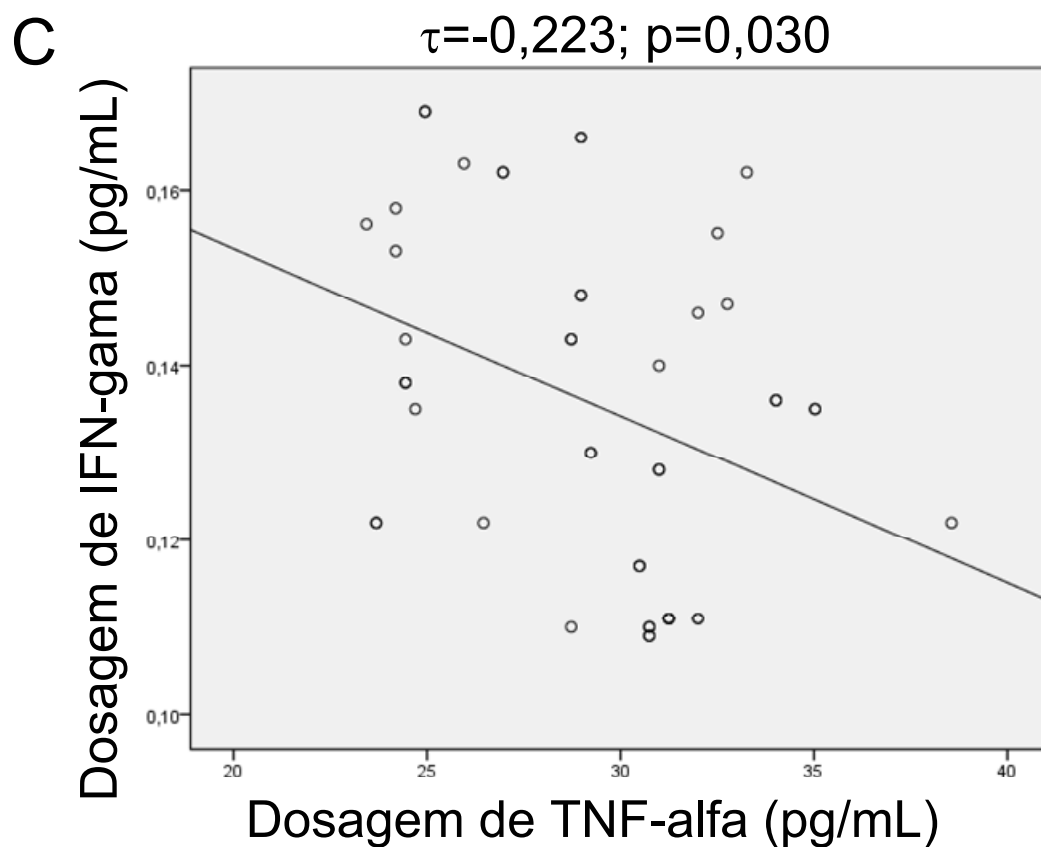
**Tabela 4.3:** Representação esquemática dos resultados obtidos nas dosagens séricas de NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no grupo controle, mulheres com NIC e CCE invasor do colo uterino

	Controle	NIC	CCE
NAG	+++	++	+
MPO	+++	+++	++
TNF- $\alpha$	++	+++	++
IFN- $\gamma$	+++	++	+++

**Nota:** NIC: Neoplasia intra-epitelial cervical. CCE: Carcinoma de células escamosas. NAG: N-Acetilglucosaminidase; MPO: Mieloperoxidase; TNF-  $\alpha$ : Fator de necrose tumoral -alfa; IFN- $\gamma$ : Interferon-gama.

As dosagens de NAG e MPO foram realizadas por ensaio enzimático e as dosagens de TNF-  $\alpha$  e IFN- $\gamma$  foram realizadas pelo método imunoenzimático de ELISA.





**Figura 4.1:** Correlação dos níveis séricos de NAG, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em mulheres com lesões pré-invasoras e invasoras do colo uterino.

**Nota:** NAG: N-Acetilglucosaminidase; TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral-alfa; IFN- $\gamma$ : Interferon-gama.

A correlação entre as variáveis foi feita pelo teste de *Kendall's tau*.

#### **4.3. Associação das dosagens séricas de NAG, MPO, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ com o grau das lesões pré-invasoras e estadiamento do CCE invasor do colo uterino**

Não houve associação das dosagens séricas de NAG ( $p=0,480$ ), MPO ( $p=0,512$ ), TNF- $\alpha$  ( $p=0,437$ ) e IFN- $\gamma$  ( $p=0,056$ ) com o grau das lesões pré-invasoras do colo uterino (Tabela 4.4). O estadiamento do CCE invasor não se associou com os níveis séricos de NAG ( $p=0,684$ ), MPO ( $p=0,235$ ), TNF- $\alpha$  ( $p=0,117$ ) e IFN- $\gamma$  ( $p=0,838$ ) (Tabela 4.5).

---

**Tabela 4.4:** Associação das dosagens séricas de NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  com o grau das lesões pré-invasoras do colo uterino.

	NIC I	NIC II	NIC III	P
	(n= 2)	(n= 8)	(n= 20)	
NAG (nmol/mL)	70,7 (60,8-70,7)	86,9 (73,1-94,0)	84,9 (64,4-104,3)	0,480
MPO (D.O.450nm/mL)	10,3 (10,2-10,3)	9,2 (7,2-10,8)	10,0 (8,7-11,1)	0,512
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	32,1 (30,0-32,1)	29,2 (28,7-34,0)	31,2 (30,7-35,0)	0,437
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	0,15 (0,14-0,15)	0,14 (0,13-0,15)	0,11 (0,11-0,14)	0,056

**Nota:** NIC: Neoplasia intra-epitelial cervical; NAG: N-Acetilglucosaminidase; MPO: Mieloperoxidase; TNF-  $\alpha$ : Fator de necrose tumoral-alfa; IFN- $\gamma$ : Interferon-gama.

Os valores foram expressos em medianas e intervalos interquartis (P25-75). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Kuskall Wallis.

**Tabela 4.5:** Comparação das dosagens séricas de NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em mulheres com estadiamento.

	IA2	IB1	IB2	IIA	P
	(n= 3)	(n= 19)	(n= 2)	(n= 6)	
	63,2	72,6	62,1	72,6	
NAG (nmol/mL)	(55,8- 63,2)	(55,0- 80,0)	(50,6- 62,1)	(38,2- 110,0)	0,684
MPO	9,1	8,4	7,0	9,3	
(D.O.450nm/mL)	(6,5-9,1)	(7,3-9,0)	(6,4-7,0)	(8,0-9,6)	0,235
	28,6	30,5	23,6	24,9	
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	(26,0- 28,6)	(24,6- 33,4)	(23,4- 23,6)	(24,6- 31,4)	0,117
IFN- $\gamma$	0,14	0,14	0,14	0,15	
(pg/mL)	(0,11- 0,14)	(0,12-0,16)	(0,12- 0,14)	(0,12- 0,17)	0,838

**Nota:** CCE: Carcinoma de células escamosas. NAG: N-Acetilglucosaminidase; MPO: Mieloperoxidase; TNF-  $\alpha$ : Fator de necrose tumoral-alfa; IFN- $\gamma$ : Interferon-gama.

Os valores foram expressos em medianas e intervalos interquartis (P25-75). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Kuskall Wallis.



## *5. Discussão*

---

Neste estudo foram avaliadas as dosagens de NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  no soro de mulheres com lesões pré-invasoras e invasoras do colo uterino, visando determinar possíveis marcadores da resposta inflamatória que poderiam estar relacionados com a progressão e/ou regressão das lesões. Essas enzimas e citocinas estudadas participam de importantes etapas do processo inflamatório. A identificação de novos marcadores pode ser valiosa para um melhor entendimento do processo da resposta inflamatória envolvida em um melhor prognóstico e seguimento das pacientes.

As dosagens das atividades das enzimas NAG e MPO correlacionam-se respectivamente, com a quantidade de neutrófilos e macrófagos recrutados, possibilitando demonstrar estes componentes inflamatórios de forma quantitativa nos vários processos em que participam [29, 34, 35, 48]. Esses métodos têm sido utilizados em trabalhos experimentais com camundongos em tumores de Ehrlich e colon [49, 50]. O ensaio imunoenzimático (ELISA) também tem sido amplamente utilizado para determinação dos níveis de citocinas em uma variedade de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* [49, 51, 52]. Estudos usaram esta metodologia para dosagem sérica de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em mulheres com carcinoma do colo uterino [53, 54].

A presença de um infiltrado inflamatório tumoral parece ser um sinal positivo de imunovigilância, e favorável ao hospedeiro. Entretanto, dependendo dos tipos celulares envolvidos nas resposta anti-tumorais, podem ou não favorecer a progressão tumoral [55, 56].

---

Estudos mostram que macrófagos estão aumentados no NIC e no carcinoma cervical, e que o aumento dessas células está relacionado com a progressão desses carcinomas [57-60]. Analisando o resultado da dosagem de NAG no nosso estudo, vimos que, diferente da literatura, houve uma diminuição da atividade desta enzima do grupo controle para o grupo de mulheres com NIC e destas para o grupo com CCE invasor. Relacionando a diminuição desta enzima com a atividade dos macrófagos, pode-se inferir que a ativação destas células diminuiu progressivamente com a progressão desta doença.

Estudos experimentais mostraram que, na ausência de macrófagos, o infiltrado de neutrófilos aumenta, substituindo a função dos macrófagos, que induzem a progressão de NIC para neoplasia de colo uterino [61]. E dosagens séricas em mulheres mostram que o número absoluto de neutrófilos é maior no soro das mulheres com lesões invasoras do colo uterino quando comparadas com NIC e controle [62]. Entretanto, o efeito antitumoral dos neutrófilos já havia sido sugerido como importante mecanismo na eliminação de células tumorais [63-65]. No presente estudo, a dosagem de MPO sugere que houve uma diminuição na atividade de neutrófilos em mulheres com CCE invasor quando comparadas com mulheres com NIC e o grupo controle. Pode-se sugerir que a diminuição da atividade destas células, que possuem uma ação antitumoral, estejam de certa forma auxiliando a progressão tumoral.[63, 65]

Levando em consideração as funções das citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , podemos relacionar seus níveis com as células inflamatórias em estudo. Percebe-se que, assim como na atividade do NAG e MPO, houve diminuição do nível de TNF- $\alpha$

---

em mulheres com CCE invasor quando comparados com mulheres com NIC. Esse dado pode ser explicado pelo fato de  $\text{TNF-}\alpha$  ser uma citocina biossintetizada pelos macrófagos e ter a função de ativar neutrófilos [38, 39]; [38, 41]. Lesões pré-invasoras que apresentam regressão têm um infiltrado significativo de macrófagos que coram positivamente pela imunohistoquímica para  $\text{TNF-}\alpha$  e isto correlaciona com apoptose das células epiteliais infectadas [66]. Pelo  $\text{IFN-}\gamma$  ser um ativador de macrófagos, pode-se explicar o resultado oposto quando comparamos suas dosagens com as de NAG [46]. O aumento dos níveis de  $\text{IFN-}\gamma$  poderia ser uma resposta à diminuição do número de macrófagos em mulheres com CCE invasor do colo uterino.

Em pacientes com NIC e CCE invasor do colo uterino, há um predomínio da resposta imune do tipo Th1 e de suas citocinas pró-inflamatórias. Níveis diminuídos de citocinas Th1 e aumentados de Th2 estão associados à progressão da lesão [5]. A resposta imune na presença do HPV tem predomínio de citocinas do tipo Th2 (imunoinibitórias ou supressoras), estas podem estar localmente na região cervical ou na circulação periférica, sendo que a presença dessas propicia um ambiente favorável às transformações malignas, permitindo assim a progressão das NICs para o câncer cervical [19]. Sendo assim, o desvio do padrão Th1 para o Th2 foi associado com a progressão da lesão e, conseqüentemente, a um pior prognóstico da paciente [67, 68]. Apesar da regressão das verrugas genitais e das neoplasias cervicais estarem relacionadas com o padrão Th1 ( $\text{IL-2}$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  e  $\text{TNF-}\alpha$ ), baixos níveis de  $\text{IFN-}\gamma$  foram associados ao desenvolvimento do câncer cervical com pior prognóstico [69].

---

No presente trabalho, foram estudadas duas citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 e observou-se que estas tiveram um padrão de expressão oposto. Enquanto os níveis de TNF- $\alpha$  diminuíram de acordo com a progressão da lesão, os níveis de IFN- $\gamma$  aumentaram. Alterações nos níveis de produção de citocinas têm sido relatadas em diversos tipos de cânceres, incluindo tumores ginecológicos. Diversos estudos sugerem importante papel do TNF- $\alpha$  devido a sua citotoxicidade, contra células tumorais, estimular macrófagos e, inibir fatores de crescimento [70]. Estudos apontam aumento da concentração de TNF- $\alpha$  em pacientes com NIC [71, 72]. Entretanto, em outros trabalhos observou-se decréscimo sistêmico de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2) relacionados ao aumento do grau da NIC [63, 73]. Sugere-se que a persistência da infecção viral do HPV se daria por falha em expressar citocinas Th1 [74]. Estudos *in vivo* mostram que TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  são dependentes um do outro, e que os efeitos contrários ou sinérgico entre as duas citocinas, dependem do estágio de diferenciação e maturação celular [75].

Nesse estudo, quando comparamos conjuntamente os grupos com lesões pré-neoplásicas e neoplásicas com o grupo controle, observamos uma redução significativa na expressão do TNF- $\alpha$ , o que nos permite inferir que esta citocina pode não estar influenciando na progressão da lesão, pois, caso contrário, deveria apresentar crescimentos constantes e significativos à medida que aumenta o grau da lesão.

Há evidência de que uma redução na expressão do IFN- $\gamma$  pode influenciar nos mecanismos inflamatórios e imunológicos no câncer cervical [76]. Também se

---

observam resultados contraditórios em relação à secreção e expressão de IFN- $\gamma$ . A expressão local de citocinas Th1 como IFN- $\gamma$  e IL-2 encontravam-se elevadas em pacientes com lesão cervical, quando comparadas aos controles e existe uma relação direta entre a progressão da lesão e o aumento do IFN- $\gamma$  [71]. A super-expressão dessa citocina pode ocorrer devido a uma resposta das células cervicais à gravidade da lesão, o que sugere que o perfil Th1 seria o tipo de resposta das células cervicais anormais, em reação à presença do HPV [74]. Esses dados vêm reforçar nossos achados, onde observamos um aumento linear e gradativo do IFN- $\gamma$  de forma proporcional ao grau da lesão.

A expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias estão aumentadas durante o NIC III e o câncer cervical invasivo [77, 78]. Em oposição a estes achados, células de carcinoma cervical e células imortalizadas por HPV *in vitro* possuem uma redução das citocinas pró-inflamatórias [79], o que demonstra claramente que o microambiente é de fundamental importância para liberação destes fatores, sendo capaz de expressar e secretar diferentes níveis e perfis de citocinas, sendo de grande importância na resposta imune contra a infecção pelo HPV e na oncogênese das lesões cervicais [80].

Mulheres com resposta pró-inflamatória reduzida são mais susceptíveis à persistência viral e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de neoplasia cervical. A ausência da resposta inflamatória é característica de lesões cervicais persistentes. Estudos recentes sugerem que alguns produtos gênicos do HPV poderiam bloquear diretamente a atividade dos mediadores inflamatórios [81]. O mesmo podemos dizer em nosso estudo, onde verificamos

---

uma diminuição da resposta inflamatória de acordo com a progressão da lesão do colo uterino. Muitos estudos mostram as lesões pré-invasoras como doença de atuação local, mas no presente estudo, podemos verificar o comportamento sistêmico tanto do NIC [82].

Com base nos resultados obtidos, torna-se clara a complexidade da resposta inflamatória relacionada com as lesões pré-invasoras e invasoras do colo uterino. Evidencia-se a importância de mais estudos para um maior entendimento dos processos biológicos e clínicos e como estes podem auxiliar no prognóstico e seguimento das pacientes. Estudos comparando os perfis de resposta inflamatória local e sistêmica podem ajudar a entender melhor o papel destas moléculas no processo de carcinogênese.

---

## *6. Conclusão*

---



O estudo da resposta inflamatória pelas dosagens dos marcadores inflamatórios NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  permite concluir que:

- A progressão do processo de carcinogênese nas neoplasias de colo uterino associou-se com uma diminuição da resposta inflamatória sérica.
  - A resposta inflamatória sérica não se associou com o grau das lesões pré-invasoras e estadiamento do CCE invasor do colo uterino.
-

## *7. Referências Bibliográficas*

---

1. BRASIL, *Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil*, M.d. Saúde, Editor. 2009, Instituto Nacional do Câncer: Rio de Janeiro. p. 98.
  2. de Araujo Souza, P.S. and L.L. Villa, *Genetic susceptibility to infection with human papillomavirus and development of cervical cancer in women in Brazil*. Mutat Res, 2003. 544(2-3): p. 375-83.
  3. Pinto, A.P., S. Tulio, and O.R. Cruz, *[Hpv cofactors in cervical carcinogenesis]*. Rev Assoc Med Bras, 2002. 48(1): p. 73-8.
  4. Kumar, V.C., R.S; Schoen, F.J., *Robbins - Patologia estrutural e funcional*. 7 ed. 2005: Editora Elsevier.
  5. Longworth, M.S. and L.A. Laimins, *Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. 68(2): p. 362-72.
  6. Spellberg, B. and J.E. Edwards, Jr., *Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases*. Clin Infect Dis, 2001. 32(1): p. 76-102.
  7. Dejana, E., M. Corada, and M.G. Lampugnani, *Endothelial cell-to-cell junctions*. Faseb J, 1995. 9(10): p. 910-8.
  8. Ravage, Z.B., et al., *Mediators of microvascular injury in dermal burn wounds*. Inflammation, 1998. 22(6): p. 619-29.
  9. Wahl, S.M., *Inflammation and growth factors*. J Urol, 1997. 157(1): p. 303-5.
  10. Wu, R., et al., *Macrophage contributions to ovarian function*. Hum Reprod Update, 2004. 10(2): p. 119-33.
  11. Erwig, L.P., et al., *Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines*. J Immunol, 1998. 161(4): p. 1983-8.
  12. Calogero, A.E., et al., *Macrophage-derived cytokines in the follicular fluids of women with infertility due to immunological causes. Elevated levels of interleukin 6 and low levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Cytokine, 1998. 10(10): p. 814-8.
  13. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. N Engl J Med, 1986. 315(26): p. 1650-9.
-

14. Eccles, S.A. and P. Alexander, *Sequestration of macrophages in growing tumours and its effect on the immunological capacity of the host*. Br J Cancer, 1974. 30(1): p. 42-9.
  15. Russell, S.W., et al., *Inflammatory cells in solid murine neoplasms. II. Cell types found throughout the course of Moloney sarcoma regression or progression*. Int J Cancer, 1976. 18(3): p. 331-8.
  16. Talmadge, J.E., M. Key, and I.J. Fidler, *Macrophage content of metastatic and nonmetastatic rodent neoplasms*. J Immunol, 1981. 126(6): p. 2245-8.
  17. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet, 2001. 357(9255): p. 539-45.
  18. Polverini, P.J., *Role of the macrophage in angiogenesis-dependent diseases*. Exs, 1997. 79: p. 11-28.
  19. Ahmed, S.M., et al., *The cellular response associated with cervical intraepithelial neoplasia in HIV+ and HIV- subjects*. Scand J Immunol, 2002. 56(2): p. 204-11.
  20. Negus, R.P., et al., *Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines*. Am J Pathol, 1997. 150(5): p. 1723-34.
  21. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammatory cells and cancer: think different!* J Exp Med, 2001. 193(6): p. F23-6.
  22. Giannini, S.L., et al., *Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression*. Clin Exp Immunol, 1998. 113(2): p. 183-9.
  23. Matsuda, M., et al., *Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression*. J Exp Med, 1994. 180(6): p. 2371-6.
  24. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(9): p. 745-56.
  25. Balkwill, F., *Tumor necrosis factor or tumor promoting factor?* Cytokine Growth Factor Rev, 2002. 13(2): p. 135-41.
  26. Evans, E.M., et al., *Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes*. Cancer Res, 1997. 57(14): p. 2943-50.
-

27. Bailey, P.J., A. Sturm, and B. Lopez-Ramos, *A biochemical study of the cotton pellet granuloma in the rat. Effects of dexamethasone and indomethacin*. *Biochem Pharmacol*, 1982. 31(7): p. 1213-8.
  28. Carollo, M., et al., *Analysis of the temporal expression of chemokines and chemokine receptors during experimental granulomatous inflammation: role and expression of MIP-1alpha and MCP-1*. *Br J Pharmacol*, 2001. 134(6): p. 1166-79.
  29. Bailey, P.J., *Sponge implants as models*. *Methods Enzymol*, 1988. 162: p. 327-34.
  30. Bos, A.J., et al., *Some enzymatic characteristics of eosinophil peroxidase from patients with eosinophilia and from healthy donors*. *Infect Immun*, 1981. 32(2): p. 427-31.
  31. Schneider, T. and A.C. Issekutz, *Quantitation of eosinophil and neutrophil infiltration into rat lung by specific assays for eosinophil peroxidase and myeloperoxidase. Application in a Brown Norway rat model of allergic pulmonary inflammation*. *J Immunol Methods*, 1996. 198(1): p. 1-14.
  32. Suzuki, K., et al., *Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes*. *Anal Biochem*, 1983. 132(2): p. 345-52.
  33. Sorensen, O. and N. Borregaard, *Methods for quantitation of human neutrophil proteins, a survey*. *J Immunol Methods*, 1999. 232(1-2): p. 179-90.
  34. Cross, A.S., et al., *Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity*. *J Biol Chem*, 2003. 278(6): p. 4112-20.
  35. Mullane, K.M., R. Kraemer, and B. Smith, *Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium*. *J Pharmacol Methods*, 1985. 14(3): p. 157-67.
  36. Krawisz, J.E., P. Sharon, and W.F. Stenson, *Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models*. *Gastroenterology*, 1984. 87(6): p. 1344-50.
  37. Baldus, S., et al., *Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion*. *Free Radic Biol Med*, 2004. 37(6): p. 902-11.
-

38. Borish, L.C. and J.W. Steinke, 2. *Cytokines and chemokines*. J Allergy Clin Immunol, 2003. 111(2 Suppl): p. S460-75.
  39. Sherry, B. and A. Cerami, *Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine, and autocrine control of inflammatory responses*. J Cell Biol, 1988. 107(4): p. 1269-77.
  40. Fiers, W., *Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level*. FEBS Lett, 1991. 285(2): p. 199-212.
  41. Sedgwick, J.D., et al., *Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement*. Immunol Today, 2000. 21(3): p. 110-3.
  42. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. 104(4): p. 487-501.
  43. Kasahara, T., et al., *Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets*. J Immunol, 1983. 130(4): p. 1784-9.
  44. Kasahara, T., et al., *Capacity of human large granular lymphocytes (LGL) to produce multiple lymphokines: interleukin 2, interferon, and colony stimulating factor*. J Immunol, 1983. 131(5): p. 2379-85.
  45. Young, H.A. and J.R. Ortaldo, *One-signal requirement for interferon-gamma production by human large granular lymphocytes*. J Immunol, 1987. 139(3): p. 724-7.
  46. Torrico, F., et al., *Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute Trypanosoma cruzi infection in mice*. J Immunol, 1991. 146(10): p. 3626-32.
  47. Young, H.A. and K.J. Hardy, *Role of interferon-gamma in immune cell regulation*. J Leukoc Biol, 1995. 58(4): p. 373-81.
  48. Barcelos, L.S., et al., *Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1*. J Leukoc Biol, 2005. 78(2): p. 352-8.
  49. Belo, A.V., et al., *Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice*. Life Sci, 2004. 74(23): p. 2827-37.
  50. Ferreira, M.A., et al., *Tumor growth, angiogenesis and inflammation in mice lacking receptors for platelet activating factor (PAF)*. Life Sci, 2007. 81(3): p. 210-7.
-

51. Barcelos, L.S., et al., *Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice*. *Inflamm Res*, 2004. 53(10): p. 576-84.
  52. Salcedo, R., et al., *Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression*. *Blood*, 2000. 96(1): p. 34-40.
  53. Sharma, A., et al., *Cytokines (TH1 and TH2) in patients with advanced cervical cancer undergoing neoadjuvant chemoradiation: correlation with treatment response*. *Int J Gynecol Cancer*, 2009. 19(7): p. 1269-75.
  54. Melczer, Z., et al., *ErbB-2/HER-2 protein expression, serum tumour necrosis factor-alpha (TFM-alpha) and soluble tumour necrosis factor receptor-2 (TNFR-2) concentrations in human carcinoma of the uterine cervix*. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2003. 24(2): p. 138-42.
  55. Hanahan, D., A. Lanzavecchia, and E. Mihich, *Fourteenth Annual Pezcoller Symposium: the novel dichotomy of immune interactions with tumors*. *Cancer Res*, 2003. 63(11): p. 3005-8.
  56. Oliveira-Neto, H.H., et al., *Decrease in mast cells in oral squamous cell carcinoma: possible failure in the migration of these cells*. *Oral Oncol*, 2007. 43(5): p. 484-90.
  57. Zur Hausen, H., *Intracellular surveillance of persisting viral infections*. Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression. Vol. 2. 1986: Lancet.
  58. Davidson, B., I. Goldberg, and J. Kopolovic, *Inflammatory response in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix*. *Pathol Res Pract*, 1997. 193(7): p. 491-5.
  59. al-Saleh, W., et al., *Correlation of T-helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix*. *J Pathol*, 1998. 184(3): p. 283-90.
  60. Hammes, L.S., et al., *Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression--clinicopathological correlation*. *Gynecol Oncol*, 2007. 105(1): p. 157-65.
  61. Pahler, J.C., et al., *Plasticity in tumor-promoting inflammation: impairment of macrophage recruitment evokes a compensatory neutrophil response*. *Neoplasia*, 2008. 10(4): p. 329-40.
-

62. Fernandes, P.C., Jr., et al., *Circulating neutrophils may play a role in the host response in cervical cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2007. 17(5): p. 1068-74.
  63. El-Sherif, A.M., et al., *Quantitative analysis of IL-10 and IFN-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer*. J Pathol, 2001. 195(2): p. 179-85.
  64. Koga, Y., et al., *Neutrophil-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a novel mechanism of antitumor effect by neutrophils*. Cancer Res, 2004. 64(3): p. 1037-43.
  65. Fenner, J.E., et al., *Suppressor of cytokine signaling 1 regulates the immune response to infection by a unique inhibition of type I interferon activity*. Nat Immunol, 2006. 7(1): p. 33-9.
  66. Hagari, Y., et al., *Association of tumor necrosis factor-alpha gene expression and apoptotic cell death with regression of Shope papillomas*. J Invest Dermatol, 1995. 104(4): p. 526-9.
  67. Clerici, M., G.M. Shearer, and E. Clerici, *Cytokine dysregulation in invasive cervical carcinoma and other human neoplasias: time to consider the TH1/TH2 paradigm*. J Natl Cancer Inst, 1998. 90(4): p. 261-3.
  68. Clerici, M., et al., *Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection*. J Natl Cancer Inst, 1997. 89(3): p. 245-50.
  69. Tartour, E., et al., *Analysis of interleukin 6 gene expression in cervical neoplasia using a quantitative polymerase chain reaction assay: evidence for enhanced interleukin 6 gene expression in invasive carcinoma*. Cancer Res, 1994. 54(23): p. 6243-8.
  70. Haranaka, K., N. Satomi, and A. Sakurai, *Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF) against transplanted murine tumors and heterotransplanted human tumors in nude mice*. Int J Cancer, 1984. 34(2): p. 263-7.
  71. Pardo-Govea, T., et al., *[Gamma interferon (IFN-gamma), tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukins 2, 4 and 6 (IL-2, IL-4, IL-6) in cervical-uterine cells of intraepithelial neoplasia: a preliminary report]*. Invest Clin, 2005. 46(1): p. 5-13.
  72. Azar, K.K., et al., *Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions*. Hum Pathol, 2004. 35(11): p. 1376-84.
-



73. Lee, B.N., et al., *Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated CD4+ T cells of women with human papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesions*. Clin Diagn Lab Immunol, 2004. 11(2): p. 239-44.
74. Scott, M., D.P. Stites, and A.B. Moscicki, *Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection*. Clin Diagn Lab Immunol, 1999. 6(5): p. 751-5.
75. Watanabe, Y. and C.O. Jacob, *Regulation of MHC class II antigen expression. Opposing effects of tumor necrosis factor-alpha on IFN-gamma-induced HLA-DR and Ia expression depends on the maturation and differentiation stage of the cell*. J Immunol, 1991. 146(3): p. 899-905.
76. Pao, C.C., et al., *Differential expression of cytokine genes in cervical cancer tissues*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. 214(3): p. 1146-51.
77. Tjiong, M.Y., et al., *Increased IL-6 and IL-8 levels in cervicovaginal secretions of patients with cervical cancer*. Gynecol Oncol, 1999. 73(2): p. 285-91.
78. Wei, L.H., et al., *Interleukin-6 in cervical cancer: the relationship with vascular endothelial growth factor*. Gynecol Oncol, 2001. 82(1): p. 49-56.
79. Woodworth, C.D. and S. Simpson, *Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized, and carcinoma cell lines*. Am J Pathol, 1993. 142(5): p. 1544-55.
80. Hutchinson, M.L., et al., *Utility of liquid-based cytology for cervical carcinoma screening: results of a population-based study conducted in a region of Costa Rica with a high incidence of cervical carcinoma*. Cancer, 1999. 87(2): p. 48-55.
81. Lee, C.H., et al., *Hepatitis C virus core protein inhibits interleukin 12 and nitric oxide production from activated macrophages*. Virology,

*oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2008. 138(1): p. 93-9.

---

## 8. *Anexas*

---

## I. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – (COEP)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

**Parecer nº. ETIC 326/08**

**Interessado(a): Prof. Agnaldo Lopes Silva Filho**  
**Departamento de Ginecologia e Obstetrícia**  
**Faculdade de Medicina - UFMG**

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 17 de setembro de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação da resposta imune em pacientes com câncer ginecológico"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**

## II. Consentimento Livre e Esclarecido

### **TERMO DECONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidada para participar, como voluntária, em uma pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Vera Cruz pelo telefone (31) 3290 1178.

**Título do Projeto: Avaliação da resposta inflamatória em mulheres com câncer ginecológico**

**Pesquisador Responsável: Dr. Agnaldo L. Silva Filho**

Este projeto tem o objetivo de investigar a presença de algumas substâncias no sangue, que possam nos ajudar a fazer o diagnóstico precoce dos tumores ginecológicos.

A participação no estudo consiste em doar uma amostra de sangue para ser analisada. Essa participação não modifica o tratamento proposto para a sua doença. Não haverá aumento do risco de complicações devido à coleta do sangue. A coleta de sangue será realizada no momento da punção para administração do soro.

A sua identidade será preservada e o seu direito de não participar no estudo não a prejudicará no seu tratamento.

Após ler e receber explicações sobre a pesquisa, e ter meus direitos de:

1. receber resposta a qualquer pergunta e esclarecimento sobre os procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados à pesquisa;
2. retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo;
3. não ser identificado e ser mantido o caráter confidencial das informações relacionadas à privacidade.

Declaro estar ciente do exposto e desejar participar do projeto de pesquisa.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_.

Nome do sujeito/ ou do responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Eu, Agnaldo L. Silva Filho , declaro que forneci todas as informações referentes ao projeto ao participante e/ou responsável.

\_\_\_\_\_  
Telefone : 31 92250909

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

## 9. *Summary*

---

**Introduction:** The inflammatory response is an active process in cervical cancer and may act in the progression and/or regression of the lesion. At the site of inflammation cells are present, among the most important macrophages and neutrophils and some cytokines such as TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . This study aims to evaluate the inflammatory response levels in women with pre-invasive lesions and invasive cervical cancer.

**Methods:** Were analyzed serum samples obtained from women without evidence of disease (n = 30 - control group), with pre-invasive lesions of the cervix (n = 30) and with carcinoma of the cervix (n = 30). The activity of inflammatory enzymes N-acetylglucosaminidase (NAG) and myeloperoxidase (MPO) were obtained by enzymatic assay. We used the ELISA assay method for obtaining serum levels of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . The blood of the patients was collected, centrifuged and stored until laboratory analysis. Differences between groups were evaluated by chi-square, Kruskal-Wallis and Mann Whitney. The correlation between the groups was performed using Kendall's Tau. Differences with  $p < 0.05$  were considered significant.

**Results:** The women age ranged from 30 to 79 years. In the group of patients with pre-invasive lesions of the cervix, two had CIN I (6.7%), eight patients with CIN II (26.7%) and 20 cases had CIN III (66.7%). Staging (FIGO) of patients with SCC was IA2 in three cases (10.0%), IB1 in 19 (63.3%), IB2 in two (6.7%) and IIA in six women (20.0%). The activities of enzymes NAG, and MPO and the levels of TNF- $\alpha$  were higher in women with CIN compared with the group with SCC. The levels of IFN- $\gamma$  were lower in the group of women with CIN compared with the group with SCC. There was not a significant association between the degree of the CIN and the staging of the SCC of the cervix with inflammation assessed by the levels of inflammatory markers used.

**Conclusion:** The inflammatory response had a decrease in accordance with the progression of the carcinogenic process: control group, women with CIN and women with invasive SCC, there was no association between the degree of pre-invasive lesions and staging of the SCC of the cervix .

**Keywords:** Cervical cancer, inflammation, NAG, MPO, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ .

---