



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
MARA ROSA

PERFIL DE CITOCINAS NA SECREÇÃO ENDOCERVICAL E NO SORO  
PERIFÉRICO DE PACIENTES COM LESÕES PRECURSORAS E CÂNCER  
CERVICAL

UBERABA- MG  
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
MARA ROSA

PERFIL DE CITOCINAS NA SECREÇÃO ENDOCERVICAL E NO SORO  
PERIFÉRICO DE PACIENTES COM LESÕES PRECURSORAS E CÂNCER  
CERVICAL

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Antoniazi  
Michelin

Coorientador: Prof. Dr. Eddie Fernando  
Cândido Murta.

UBERABA- MG

2018



# *Dedicatória*

Aos meus pais Arnaldo e Conceição que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, ao apoio e à dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Sempre me ensinaram a agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. Agradeço pela paciência e compreensão pela minha ausência durante essa longa jornada. MUITÍSSIMO obrigada. Amo vocês!

Aos meus irmãos Rafael e Gabriela pela amizade, carinho e companheirismo de sempre; por estarem sempre torcendo pelas minhas conquistas. Pelo apoio e incentivo incondicionais.

# *Agradecimentos especiais*

À Pro<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Márcia Antoniazi Michelin

Mais que uma orientadora, uma amiga. Minha sincera gratidão, não só pelos ensinamentos e pela oportunidade de poder desenvolver este trabalho, mas também por todo o incentivo, pela convivência, confiança, paciência e, principalmente, pela amizade, pelo companheirismo e por toda compreensão nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta

Muito obrigada pelo apoio, coorientação e esclarecimentos prestados no decorrer do curso.

# *Agradecimentos*

A Deus por me guiar durante todos os passos da minha vida e por permitir a realização desse trabalho.

À minha querida amiga Andjara, da qual a princípio tinha muito receio em me aproximar, mas que o tempo me mostrou que é uma pessoa de coração do tamanho do mundo e que não mede esforços para ajudar. Sempre de braços abertos e capaz de adivinhar os gostos e os desejos. Agradeço toda ajuda com a minha dissertação.

Ao Dr. Mário Sérgio pela amizade, pelo companheirismo, pela confiança no meu trabalho. Agradeço todas as DRs – “discussões de relacionamento”. Você faz parte da minha vida há muito tempo.

À Dra. Ana Cristina, agradeço a ajuda na coleta das amostras das pacientes. Mas, acima de tudo, por se tornar minha amiga e minha médica preferida. Tenho muito orgulho de ter “trabalhado” com você, pois passei a admirá-la mais ainda. Obrigada por todos os ensinamentos.

Aos médicos pelos ensinamentos dentro da Ginecologia e Obstetrícia, em especial aos amigos Dra. Fernanda, Dra. Karina, Dra. Fátima, Dr. Trovó e Dr. Takeo.

À Sueli Riul e à Marcia Tasso: eternas professoras e profissionais exemplares. Ao longo da caminhada de graduação tornaram-se amigas. Compartilhamos alegrias e conquistas. Amo vocês.

Aos colegas do IPON, obrigada pela ajuda e ensinamentos. Em especial à Ângela e à Letícia pelo auxílio no desenvolvimento do artigo gerado a partir desse trabalho.

Aos técnicos do IPON Luan e Cláudio. Em especial ao Cláudio por toda a paciência e auxílio na realização dos procedimentos de ELISA.

Às meninas da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia – Andrea, Fátima, Simone e Ângela. Muito obrigada pelo carinho, sempre que ia buscar a chave do IPON do ambulatório, e pelas vezes que atrasaram o horário de almoço para que eu pudesse devolver a chave.

Às meninas da Citologia – Nilva, Nair, Daniela e Rosa: obrigada pelo companheirismo e pela amizade. Vocês se tornaram parte da minha família. Amo vocês de coração.

Aos médicos da Citologia, Dra. Vera e Dr. João, obrigada pela atenção e pelos ensinamentos sempre que eu estava no Ambulatório.

A todos os amigos, em especial Ana Paula Beleli, Fernando, Getúlio, Rogério, Valeska e Willian Manzan. Agradeço pela paciência e pela compreensão com minha ausência durante essa longa jornada.

Aos colegas da FATCHUS – obrigada pelo incentivo e apoio durante a caminhada. Em especial à Tati Marques, pela ajuda com o inglês; ao Douglas Abdalla, pela ajuda com os resultados e ao George e à Dayana, pela compreensão e pelo incentivo.

Às pacientes – as principais protagonistas. Agradeço pela colaboração com a Ciência e, ao mesmo tempo, pela lição de vida que me ensinaram.

*Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.*

*Cora Coralina*

## RESUMO

A evolução do câncer cervical, na maioria dos casos, se dá de forma lenta, passando por fases pré-clínicas detectáveis e curáveis. Como mediadores das respostas imunológica e inflamatória, as citocinas podem atuar de forma antagônica (inibindo o efeito de outra) e sinérgica (duas ou mais citocinas potencializando seus efeitos). Possuem, também, funções de crescimento e diferenciação de linfócitos (fase de ativação); ativação das células efectoras (imunidade inata e adquirida) e o desenvolvimento de células hematopoiéticas. O objetivo deste estudo foi comparar o perfil de citocinas (TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) no soro e na secreção endocervical de mulheres com lesão de baixo, lesão de alto grau e câncer cervical invasor. Foi avaliada, por ensaio imunoenzimático (ELISA), a presença dessas citocinas na secreção endocervical e no soro periférico de 100 mulheres com alterações no colo uterino, sendo 15 com câncer cervical invasivo, 45 com lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) e 40 com lesão intraepitelial de alto grau (HSIL). Como análise estatística, foram realizados o teste de Mann Whitney, considerando o  $p \leq 0,05$  como amostragem significativa. Quanto ao perfil Treg (estudo da TGF- $\beta$ ), percebe-se dosagens de citocinas na secreção vaginal semelhante entre os três grupos estudados, enquanto que no soro periférico dosagem foi maior no grupo LSIL. Ao relacionar as citocinas do perfil Th2 (IL-4 e IL-10), houve aumento dessas citocinas na secreção endocervical de acordo com a progressão da doença. Já no soro periférico dessas mesmas citocinas houve uma concentração maior de IL-4 no grupo HSIL e uma concentração maior de IL-10 no câncer cervical. No estudo das citocinas do perfil Th1 (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) tem-se um aumento na secreção endocervical de IL-2 e IL-12 no grupo com câncer cervical e o TNF- $\alpha$  teve seu aumento com a progressão da doença. Na dosagem dessas citocinas do perfil Th1 no soro periférico, a IL-2 mostrou-se maior concentração no grupo com câncer, já a IL-12, e o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  estão em maior concentração no grupo LSIL, polarizando para um perfil Th1 com características antitumorais. Na análise da secreção endocervical, nota-se aumento de IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$  de acordo com a progressão da lesão, não encontrando um padrão de citocinas específicas para cada tipo de diagnóstico, ou seja, na secreção endocervical observa-se tanto um padrão Th1 quanto Th2 e essa dicotomia pode induzir à persistência da infecção e promover, assim, a progressão das lesões cervicais.

**Palavras chaves:** Citocinas, câncer cervical, lesão cervical



## ABSTRACT

Uterine's cancer evolution, in most cases, occurs slowly, passing through pre-clinical, detectable and curable phases. As mediators of immune and inflammatory responses, cytokines can act antagonistically (inhibiting others effect) and synergistically (two or more cytokines potentializing each other effects). They also have a role in lymphocyte growth and differentiation (activation phase); activation of effector cells (innate and acquired immunity) and development of hematopoietic cells. The aim of this study was to compare cytokines profile (TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) in serum and endocervical secretion of low, high grade and invasive cervical cancer. These cytokines levels were evaluated by immunoenzymatic assay (ELISA) in endocervical secretion and in peripheral serum of 100 women with alterations in uterine cervix were 15 of them with invasive cervical cancer, 45 with low grade intraepithelial lesion (LSIL) and 40 with intraepithelial lesion high-grade (HSIL). As statistical analysis, Mann Whitney test was performed considering  $p \leq 0.05$  as significant sampling. RESULT. As a result, the Treg profile (TGF- $\beta$  study) shows similar cytokine concentrations in the vaginal secretion between the three groups studied as a higher peripheral serum dosage in the LSIL group. As results, about Treg profile (TGF- $\beta$  study), it was realized similar cytokine concentrations in vaginal secretion between the three groups, on the other hand, it was observed higher peripheral serum dosage in LSIL group. Relating Th2 profile cytokines (IL-4 and IL-10), it was verified that these cytokines increased in endocervical secretion according to disease progression. On peripheral serum dosage of these same cytokines, higher IL-4 concentration were detected in HSIL group followed by higher IL-10 concentration in cervical cancer. Studying Th1 profile cytokines (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ), there was an increase in endocervical secretion of IL-2 and IL-12 in cervical cancer group and TNF- $\alpha$  had its increased levels within disease progression. Dosing these Th1 profile cytokines in peripheral serum, higher IL-2 concentration was detected in cancer group, whereas IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  are higher in LSIL group, polarizing to a Th1 profile with anti-tumoral features. Analyzing endocervical secretion, it was noted an increase in IL-4, IL-10 and TNF- $\alpha$  levels according to lesion progression, not having a specific cytokine pattern for each diagnosis type, that is, both Th1 and Th2 cytokines, and this dichotomy may induce infection persistence, thus promoting cervical lesions progression.

**Key-words:** cytokines, cervical cancer, cervical lesion.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Dosagem da citocina TGF- $\beta$  no soro periférico e na secreção endocervical de pacientes com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical. **A concentração de TGF- $\beta$  manteve-se semelhante na análise na secreção endocervical e apresentou-se elevada no soro periférico de paciente com LSL.** O TGF- $\beta$  foi dosado na secreção endocervical e no soro periférico através do método de ELISA e a análise estatística dos dados por Mann Whitney. Observa-se significância na concentração de TGF- $\beta$  no soro periférico entre os grupos LSIL e HSIL com  $p=0,0303$  (\*), e entre os grupos LSIL e câncer cervical invasivo com  $p=0,0451$  (\*). LSIL (lesão intraepitelial de baixo grau), HSIL (lesão intraepitelial de alto grau)..... 40

**Figura 2** – Correlação por grupos da dosagem de TGF- $\beta$  na secreção endocervical e soro periférico nos grupos de pacientes com diferentes diagnósticos: (A) LSIL; (B) HSIL; (C) câncer cervical invasivo. **Nos três grupos observa-se uma distribuição semelhante de TGF- $\beta$ , com predomínio maior na secreção endocervical.** Houve significância estatística no grupo de pacientes com LSIL com  $p=0,0005$ . Os três grupos apresentaram uma correlação fraca. .... 41

**Figura 3** – Dosagem da citocina IL-4 no soro periférico e na secreção endocervical de pacientes com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical. **Pacientes com HSIL apresentam concentração elevada de IL-4 tanto na secreção endocervical quanto no soro periférico.** IL-4 foi dosada na secreção endocervical e no soro periférico através do método de ELISA, e análise dos dados por Mann Whitney. Observa-se significância estatística entre os grupos LSIL e HSIL com  $p<0,0001$ (\*\*\*) e entre os grupos LSIL e câncer invasivo com o  $p<0,0001$  (\*\*\*) quando se analisa a secreção endocervical. Já a concentração de IL-4 no soro periférico encontra-se significância estatística entre os grupos LSIL e HSIL com  $p<0,0001$  (\*\*\*), entre os grupos HSIL e câncer invasivo com  $p=0,0323$  (\*) e entre os grupos LSIL e câncer invasivo com valor de  $p<0,0001$ (\*\*\*)). LSIL (lesão intraepitelial de baixo grau), HSIL (lesão intraepitelial de alto grau)..... 42

**Figura 4** – Correlação por grupos da dosagem de IL-4 na secreção endocervical e soro periférico nos grupos de pacientes com diferentes diagnósticos: (A) LSIL; (B) HSIL; (C) câncer cervical invasivo. **Nas pacientes com LSIL e HSIL, percebe-se um comportamento semelhante, com baixa concentração de IL-4 tanto no soro periférico quanto na secreção endocervical.** Em contrapartida, nas pacientes com câncer cervical, observa-se a presença de IL-4 na secreção endocervical. Mas os três grupos apresentaram uma correlação fraca..... 43

**Figura 5** – Dosagem da citocina IL-10 no soro periférico e na secreção endocervical de pacientes com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical. **A concentração de IL-10 manteve-se elevada tanto na secreção endocervical e quanto no soro periférico no grupo de mulheres com câncer cervical invasivo.** A dosagem de IL-10 no soro periférico e na secreção endocervical foi realizada por ELISA e a análise estatística por Mann Whitney. Observa-se significância estatística ao analisarmos a secreção endocervical entre os grupos LSIL e câncer cervical invasivo com  $p = 0,0014$  (\*\*), entre os grupos HSIL e câncer cervical com  $p=0,0039$  (\*\*). Com relação à dosagem no soro periférico, observa-se significância entre LSIL e câncer cervical com  $p < 0,0001$  (\*\*\*) e entre o HSIL e câncer invasivo com  $p < 0,0001$  (\*\*\*). LSIL (lesão intraepitelial de baixo grau), HSIL (lesão intraepitelial de alto grau)..... 44

**Figura 6** – Correlação por grupos da dosagem de IL-10 na secreção endocervical e soro periférico nos grupos de pacientes com diferentes diagnósticos: (A) LSIL; (B) HSIL; (C) câncer cervical invasivo. **Observa-se uma expressão de IL-10 na secreção endocervical os grupos LSIL e HSIL com valores de  $r^2=0,01657$  e  $r^2=0,008415$ , respectivamente. Entretanto, nos três grupos houve uma correlação fraca**..... 45

**Figura 7** – Dosagem da citocina IL-2 no soro periférico e na secreção endocervical de pacientes com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical. **A concentração de IL-2 está elevada na secreção endocervical nos grupos HSIL e câncer cervical, já no soro há elevação no grupo com câncer cervical invasivo.** A dosagem de IL-2 no soro periférico e na secreção endocervical foi realizada por ELISA e a

análise estatística por Mann Whitney. Não houve significância estatística. LSIL (lesão intraepitelial de baixo grau), HSIL (lesão intraepitelial de alto grau)..... 46

**Figura 8** – Correlação por grupos da dosagem de IL-2 na secreção endocervical e soro periférico nos grupos de pacientes com diferentes diagnósticos: (A) LSIL; (B) HSIL; (C) câncer cervical invasivo. **Observa-se uma baixa dosagem de IL-2 tanto na secreção endocervical quanto no soro periférico, sendo uma correlação fraca com valores de  $r^2=0,003050$  (LSIL);  $r^2=0,005264$  (HSIL) e  $r^2=0,001274$  (câncer)..... 47**

**Figura 9** – Representa a dosagem da citocina IL-12 no soro periférico e secreção endocervical de pacientes com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical. **A IL-12 mostrou-se elevada tanto na secreção endocervical quanto no soro periférico nos grupos LSIL e câncer cervical.** A dosagem de IL-12 no soro periférico e na secreção endocervical foi realizada por ELISA e a análise estatística por Mann Whitney. Ao analisar a dosagem na secreção endocervical, obteve significância estatística entre os grupos LSIL e câncer cervical invasivo com  $p=0,0347$  (\*) e entre os grupos HSIL e câncer cervical com  $p= 0,0076$  (\*\*). Na análise do soro periférico houve significância estática entre os grupos LSIL e HSIL com  $p =0,0409$  (\*) e entre os grupos HSIL e câncer cervical invasivo com  $p=0,0317$ (\*). LSIL (lesão intraepitelial de baixo grau), HSIL (lesão intraepitelial de alto grau)..... 47

**Figura 10** – Correlação por grupos da dosagem de IL-12 na secreção endocervical e soro periférico nos grupos de pacientes com diferentes diagnósticos: (A) LSIL; (B) HSIL; (C) câncer cervical invasivo. **O grupo LSIL apresentou uma correlação moderada com valor  $r^2=0.5773$  (LSIL), enquanto os grupos HSIL e câncer cervical uma correlação fraca com valores de  $r^2=0,01447$  e  $r^2=0,007835$ , respectivamente.** Houve significância estatística no grupo LSIL com  $p<0,0001$ ..... 48

**Figura 11** – Representa a dosagem da citocina IFN- $\gamma$  no soro periférico e na secreção endocervical de pacientes com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical. **O IFN- $\gamma$  apresentou a mesma concentração na secreção endocervical nos três grupos estudados. No soro periférico, há uma concentração mais baixa no grupo HSIL quando comparado aos grupos LSIL e câncer cervical**

**invasivo.** A dosagem de IFN- $\gamma$  no soro periférico e na secreção endocervical foi realizada por ELISA e a análise estatística por Mann Whitney. Não houve valores significativos. LSIL (lesão intraepitelial de baixo grau), HSIL (lesão intraepitelial de alto grau)..... 49

**Figura 12 –** Correlação por grupos da dosagem de IFN- $\gamma$  na secreção endocervical e soro periférico nos grupos de pacientes com diferentes diagnósticos: (A) LSIL; (B) HSIL; (C) câncer cervical invasivo. **Observa-se uma expressão maior de IFN- $\gamma$  na secreção endocervical no grupo com câncer cervical invasivo. Correlação de Pearson fraca nos três grupos estudados**..... 50

**Figura 13 –** Representa a dosagem da citocina TNF- $\alpha$  no soro periférico e na secreção endocervical de pacientes com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical. **Observa-se uma concentração elevada dessa citocina na secreção endocervical no grupo com câncer cervical uterino, enquanto que no soro periférico observa-se o TNF- $\alpha$  alto no grupo LSIL.** A dosagem do TNF- $\alpha$  no soro periférico e na secreção endocervical foi realizada por ELISA e a análise estatística por Mann Whitney. Na secreção endocervical, houve significância estatística entre os grupos LSIL e câncer cervical invasivo com  $p=0,0003$  (\*\*\*) e entre o HSIL e o câncer cervical invasivo com  $p=0,0005$  (\*\*\*). No soro periférico houve significância entre os grupos LSIL e HSIL, com  $p<0,0001$ (\*\*\*), e entre os grupos HSIL e câncer cervical invasivo, com  $p=0,0030$  (\*\*). LSIL (lesão intraepitelial de baixo grau), HSIL (lesão intraepitelial de alto grau)..... 51

**Figura 14 –** Correlação por grupos da dosagem de TNF- $\alpha$  na secreção endocervical e soro periférico nos grupos de pacientes com diferentes diagnósticos: (A) LSIL; (B) HSIL; (C) câncer cervical invasivo. **Nos três grupos estudados houve uma correlação baixa com valores  $r^2=0,4842$  (LSIL),  $r^2=0,003803$  (HSIL) e  $r^2=0,09611$  (câncer cervical), respectivamente.** Houve significância estatística no grupo LSIL, com  $p<0,0001$ ..... 52

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Valores de concentração inicial em pg/mL das citocinas para início da curva padrão..... 36

**Tabela 2** – Identificação da idade e caracterização do comportamento sexual das pacientes nos grupos LSIL, HSIL e Câncer cervical, dados coletados nos prontuários das pacientes..... 39

## LISTAS DE ABREVIATURAS

- ACO – anticoncepcional oral
- APC – células apresentadoras de antígenos
- CAF – cirurgia de alta frequência
- CHP – complexo principal de histocompatibilidade
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- ELISA – ensaio imunoenzimático (do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)
- FoxP3 – do inglês *forkehead box p3*
- GATA 3 – do inglês *zinc-finger transcription fator – 3*
- HPV – papiloma Vírus Humano
- HSIL – lesão intraepitelial de alto grau
- IFN – interferon
- IL – interleucina
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- LPS – lipopolissacarídeos
- LSIL – lesão intraepitelial de baixo grau
- M1 – macrófagos tipo 1
- M2 – macrófagos tipo 2
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – Carbonato de sódio
- NIC – neoplasia intraepitelial cervical
- NK – célula Natural Killer
- PBS – solução salina fosfatada tamponada (do inglês *phosphate buffer solution*)
- RNA – ácido ribonucleico
- RNA<sub>m</sub> – RNA mensageiro
- SBF – soro bovino fetal
- SF 0,9% – soro fisiológico 0,9%
- STAT – sinal transdutor e ativador de transcrição (do inglês *signal transducer and activator of transcription*)
- TCR – receptor de células T
- TGF-β – fato de crescimento de transformação beta (do inglês *transforming growth fator*)
- Th1 – linfócitos TCD4<sup>+</sup> do tipo 1
- Th17 – linfócitos Th17

Th2 – linfócitos TCD4<sup>+</sup> do tipo 2

TMB – tetrametilbenzidina (do inglês *tetramethylbenzidine*)

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa (do inglês *tumor fator necrosis factor alfa*)

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular (do inglês *vascular endothelial growth factor*)



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
1.1 CÂNCER.....	16
1.2 CÂNCER CERVICAL.....	17
1.3 RESPOSTA IMUNE AOS TUMORES.....	20
1.3.1 Citocinas .....	23
1.4 LESÕES DO COLO UTERINO E RESPOSTA IMUNE .....	25
2 JUSTIFICATIVA .....	29
3 OBJETIVOS .....	31
3.1 OBJETIVO GERAL .....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 PACIENTES.....	33
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	33
4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	33
4.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	34
4.5 QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS POR ELISA .....	34
4.5.1 Metodologia para dosagens das citocinas .....	35
4.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	37
5 RESULTADOS .....	39
6 DISCUSSÃO .....	55
7 CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXO A – Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM (683-2006/CEP).....	73

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30

# *Introdução*

# 1 INTRODUÇÃO

## 3 1.1 CÂNCER

5 O câncer surge a partir de células que sofrem uma sequência de mutações ou  
6 alterações genéticas (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

7 Alguns estudos demonstram que uma única mutação dificilmente leva à  
8 formação de um tumor; sendo necessárias, então, várias modificações genéticas,  
9 que irão progressivamente interferir nos mecanismos responsáveis por proliferação,  
10 diferenciação e morte celular (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

11 A transformação de células normais em malignas é conhecida como  
12 neoplasia. As células malignas podem se estabelecer de forma espontânea ou  
13 simplesmente induzida por agentes químicos, físicos ou virais. Quando há quebra de  
14 integridade celular, as transformações são evidenciadas, levando, posteriormente, a  
15 alterações moleculares e fenotípicas (LOEB; HARRIS, 2008; DAROLT; FREITAS;  
16 FREITAS, 2011).

17 De acordo com Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se, para o ano de  
18 2018, cerca de 16.370 novos casos de câncer de colo uterino no Brasil. Os cânceres  
19 mais incidentes em mulheres são mama (59.700), cólon e reto (18.980) e colo de  
20 útero (16.370) (INCA, 2017).

21 Uma vez que o câncer é uma doença genética, faz-se necessária a  
22 identificação e a caracterização dos genes envolvidos na origem e na progressão da  
23 doença para um melhor conhecimento a respeito dessa doença (GUEMBAROVSKI;  
24 CÓLUS, 2008).

25 Os proto-oncogenes são os genes normais que controlam de forma positiva o  
26 crescimento, a diferenciação e a divisão mitótica da célula (WEINSTEIN; JOE,  
27 2006). Quando são expostos a agentes carcinogênicos, sejam físicos, químicos ou  
28 biológicos, os proto-oncogenes são transformados em oncogenes que, por sua vez,  
29 favorecem a proliferação anormal da célula, o que resulta na formação do tumor  
30 (GUEMBAROVSKI; CÓLUS, 2008).

31 Existem, ainda, os genes supressores tumorais, que funcionam como  
32 reguladores da proliferação celular devido a mecanismos que regulam a divisão  
33 celular (GUEMBAROVSKI; CÓLUS, 2008). O BCRA1 e o BCRA2 estão ligados ao  
34 surgimento dos cânceres de mama, ovário, próstata, cólon, pâncreas e laringe

1 (ABBAS; LICHTMAN, 2015). O p53 controla a replicação do DNA, a proliferação e a  
2 apoptose celular (PINTO et al., 2002) e, por isso, quando apresenta anormalidades,  
3 ele perde a sua função inibitória e a célula passa a ter uma proliferação  
4 desordenada e característica de células cancerosas (GUEMBAROVSKI; CÓLUS,  
5 2008).

6 As células alteradas apresentam vantagens quanto à proliferação e à  
7 resistência a mecanismos de indução de morte celular, resultando no mecanismo de  
8 evasão tumoral. Com o passar do tempo, essas células podem adquirir capacidade  
9 de invasão induzida pelo microambiente tecidual, como a formação de novos vasos  
10 e a capacidade de metástases (SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004).

11

## 12 1.2 CÂNCER CERVICAL

13

14 O câncer cervical está associado à infecção por uma linhagem oncogênica do  
15 HPV (Papiloma Vírus Humano) (DICKINSON et al., 2012.). É o terceiro tumor mais  
16 frequente na população feminina, atrás do câncer de mama e do colorretal, e a  
17 quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil com 5.430 mortes em 2013  
18 (INCA, 2017).

19 Existem diferentes tipos de papiloma vírus humano, todos com dupla fita de  
20 DNA e um capsídeo icosaédrico (RIVOIRE et al., 2001). Eles são tipificados com  
21 bases na sequência de DNA e agrupados em tipos de alto e baixo risco oncogênico  
22 (KUMAR et al., 2010).

23 Já foram descritos aproximadamente 200 genótipos do HPV, sendo os HPVs  
24 de alto risco mais comuns o HPV 16 e o HPV 18, considerados fatores mais  
25 importante na oncogênese cervical, pois são responsáveis por cerca de 70% dos  
26 casos de câncer do colo do útero. Já o HPV 6 e o HPV 11, HPVs de baixo risco,  
27 causam em 90% dos casos condiloma acuminado (LOWY, 2016; KUMAR et al.,  
28 2010).

29 Os fatores de risco estão relacionados com características do hospedeiro e da  
30 relação com o vírus: a exposição ao HPV, a oncogenicidade viral, a ineficiência da  
31 resposta imunológica e a presença de cocarcinógenos (KUMAR et al., 2010).

32 A evolução do câncer do colo do útero, na maioria dos casos, se dá de forma  
33 lenta, passando por fases pré-clínicas detectáveis e curáveis. As fases pré-clínicas  
34 são evidenciadas pelas lesões precursoras do câncer cervical, denominadas de

1 neoplasias intraepiteliais cervicais e caracterizadas por lesões proliferativas com  
2 maturação anormal e atipias de graus variáveis com substituição parcial ou total do  
3 epitélio escamoso cervical (AIDÉ et al., 2009). Essas lesões são detectadas pelo  
4 método de Papanicolau, o que o torna tão importante (ARAÚJO, 1999).

5 A classificação das lesões evoluiu ao longo do tempo, sendo que, na  
6 classificação antiga, utilizava-se a nomenclatura NIC (neoplasia intraepitelial  
7 cervical) I para as displasias leves, NIC II para as displasias moderadas e NIC III  
8 para as displasias graves. Recentemente, as lesões foram divididas em dois níveis  
9 de classificação, sendo que NIC I foi renomeada como lesão intraepitelial escamosa  
10 de baixo grau (LSIL) e NIC II e III como lesão intraepitelial escamosa de alto grau  
11 (HSIL) (KUMAR et al., 2010).

12 O diagnóstico das alterações do colo uterino é realizado através da citologia  
13 cervicovaginal, colposcopia e histologia. A citologia é importante no rastreamento das  
14 lesões precursoras do colo uterino. A colposcopia, por sua vez, é um método  
15 considerado propedêutico e utilizado para a visualização direta do colo uterino com  
16 lente de aumento e utilização de soluções, o que permite a identificação e a  
17 caracterização de lesões presentes na região do colo uterino. Já a histologia é  
18 considerada o padrão ouro para o diagnóstico das lesões no colo uterino. Ressalta-  
19 se a importância da combinação das três formas de diagnóstico para a tomada de  
20 decisão frente ao tratamento que será proposto (AIDÉ et al., 1999).

21 Segundo dados do Ministério da Saúde (INCA, 2016), a prevalência de LSIL  
22 foi de 0,8% de todos os exames citopatológicos realizados no Brasil em 2013.  
23 Considerando-se apenas os exames anormais, a prevalência de LSIL foi de 27,6%,  
24 representando o segundo diagnóstico citopatológico mais frequente, o que demanda  
25 investigação ou acompanhamento adicionais.

26 No exame citológico das LSIL, observa-se no esfregaço atipias nucleares  
27 discretas, acometendo principalmente células superficiais e algumas células  
28 intermediárias. Também é possível observar algumas alterações nucleares, como o  
29 aumento do núcleo e da coloração – tornando-se hiper cromáticos, com contornos  
30 irregulares e muitas vezes chanfrados (ARAÚJO, 1999). Já o exame colposcópico  
31 revela presença de epitélio acetobranco satélites, com áreas menos densas e  
32 menos extensas e margens irregulares angulares ou digitiformes, com pontilhados  
33 finos e mosaico finos (SELLORS, 2004). No exame histológico de uma LSIL, são  
34 visualizados núcleos aumentados, maior razão núcleo-citoplasma, hiper cromasia,

1 polimorfismo nuclear e anisocariose (variação do tamanho nuclear), poucas figuras  
2 de mitose (ARAÚJO, 1999).

3 A prevalência do diagnóstico citopatológico de HSIL no Brasil foi de 0,26% de  
4 todos os exames realizados e 9,1% de todos os exames com diagnóstico alterados  
5 em 2013. Aproximadamente 70% a 75% das mulheres com laudo de HSIL  
6 apresentaram a confirmação do grau histopatológico e 1% a 2% de carcinoma  
7 invasivo (INCA, 2016).

8 Para as HSIL, o esfregaço mostra-se com células escamosas e atípicas  
9 nucleares marcantes, tais como hiper Cromasia, grumos, espaços claros no conteúdo  
10 cromático, irregularidades na forma do núcleo e espessamento da membrana  
11 nuclear, além de alta relação núcleo-citoplasma. Pode ser representado, também,  
12 por células basais com atípicas nucleares muito intensas e alta relação núcleo-  
13 citoplasma, células que descamam agrupadas tendo limites pouco nítidos, filas  
14 indianas e células isoladas (ARAÚJO, 1999). Na colposcopia, são observadas áreas  
15 densas, opacas, branco acinzentadas, acetobranças com pontilhado e/ou mosaico  
16 grosseiro e com margens regulares e bem delimitadas, vasos atípicos (SELLORS,  
17 2004). Já no exame histológico encontram-se alterações celulares displásicas  
18 restritas à metade inferior ou aos dois terços inferiores do epitélio com anomalias  
19 nucleares mais acentuadas e presença de mitoses em toda metade inferior do  
20 epitélio. Ou podem apresentar também uma ausência de diferenciação e  
21 estratificação ou presente com numerosas figuras de mitose e com várias anomalias  
22 nucleares (ARAÚJO, 1999).

23 O câncer cervical de células escamosas é o subtipo histológico mais comum  
24 do câncer cervical (80%), tendo como precursor o HSIL. O segundo tipo mais  
25 comum é o adenocarcinoma cervical, cujo precursor é o adenocarcinoma *in situ*.  
26 (KUMAR et al., 2010). No exame citológico do câncer cervical, pode-se observar  
27 atípicas extremas, hiper Cromasia intensa, epitélio desorganizado em meio a fundo  
28 sujo devido à presença de necrose e hemorragia (ARAÚJO, 1999). A colposcopia de  
29 neoplasias invasivas em estágio inicial apresenta áreas densas, espessas, branco  
30 calcárias, com irregularidade e nodularidade superficial e com margens sobrelevada  
31 e deiscientes. As neoplasias avançadas claramente visíveis não requerem,  
32 necessariamente, a colposcopia para o diagnóstico (SELLORS, 2004).

33 O estadiamento do câncer cervical, proposto pela Federação Internacional de  
34 Ginecologia e Obstetrícia, é amplamente utilizado: estágio I – tumor restrito ao colo

1 sem extensão ao corpo uterino; estágio II – tumor invadindo o útero, mas não a  
2 parede pélvica ou terço superior da vagina; estágio III – tumor com extensão à  
3 parede pélvica e/ou comprometendo terço inferior da vagina e/ou causa hidronefrose  
4 ou rim não funcionante e estágio IV – tumor estende-se além da pelve ou invade a  
5 mucosa vesical ou do reto (PECORELLI; ZIGLIANI; ODICINO, 2009).

6 O tratamento das lesões de alto grau é realizado através de cirurgia de alta  
7 frequência (CAF) ou pela conização a frio proposto como métodos diagnóstico e  
8 muitas das vezes terapêutico (INCA, 2000b). Para o câncer cervical, as formas de  
9 tratamento são definidas conforme o estadiamento, podendo ocorrer conização,  
10 histerectomia abdominal ou vaginal, braquiterapia, radioterapia e quimioterapia  
11 (INCA, 2000a).

### 12 13 1.3 RESPOSTA IMUNE AOS TUMORES

14  
15 O sistema imunológico é formado por uma complexa rede de órgãos, células  
16 e moléculas que têm por finalidade manter a homeostase do organismo e combater  
17 as agressões gerais. Ele é dividido em imunidade inata e imunidade adquirida. A  
18 imunidade inata atua em conjunto com a imunidade adquirida (CRUVINEL et al.,  
19 2010).

20 Na imunidade inata tem-se uma resposta rápida a vários estímulos. É  
21 representada pelas barreiras físicas (pele, epitélio das mucosas dos tratos  
22 respiratório, gastrointestinal e geniturinário), químicas (substâncias antimicrobianas  
23 catelicidinas e defensinas) e biológicas, além de fagócitos (neutrófilos e macrófagos,  
24 fagocitam substâncias estranhas e as eliminam), células dendríticas (reconhecem,  
25 expressam coestimuladores e citocinas, e participam também do processo de  
26 apresentação de antígenos), células *Natural Killer* (NK) (combatem infecções virais e  
27 bactérias intracelulares), proteínas do sangue, incluído sistema complemento  
28 (opsonização, inflamação e lise celular) e citocinas (CRUVINEL et al., 2010;  
29 ABBAS; LICHTMAN, 2015).

30 Já a imunidade adquirida é subdividida em imunidade humoral e celular, sendo  
31 mais eficiente que a inata pela formação de células de memória (PAUL, 2013). O  
32 primeiro tipo de imunidade adquirida é mediado pela produção de anticorpos pelos  
33 linfócitos B que reconhecem, neutralizam e sinalizam os antígenos para sua  
34 destruição. Já a imunidade mediada por células tem a participação dos linfócitos T

1 que expressam receptores altamente diversificados permitindo o reconhecimento de  
2 uma grande variedade de substâncias (ABBAS; LICHTMAN, 2015).

3 As células T são um importante componente da imunidade adquirida e  
4 dividem-se em dois subgrupos de acordo com o receptor presente em sua  
5 superfície: CD4 (T *helper*) e CD8 (T citotóxico). As células T CD4<sup>+</sup> reconhecem o  
6 complexo CHP classe II-antígeno e são ativadas, proliferam e se tornam células T  
7 *helper* funcionais. Essas células secretam citocinas que induzem a diferenciação de  
8 outras populações celulares (JANEWAY et al., 2007). Um patógeno, ao invadir o  
9 organismo do hospedeiro, é capturado pela célula apresentadora do antígeno, que o  
10 processa e o apresenta a outras células do sistema imune adquirido, através do  
11 complexo antígeno-complexo principal de histocompatibilidade (CHP) (PARSLOW,  
12 2004).

13 Essa imunidade adquirida antígeno-específica é muito importante, uma vez  
14 que produz células T e B de memória que permanecem por longo período no  
15 organismo. Desse modo, após uma segunda exposição, ocorre uma resposta rápida  
16 e eficaz (KOBAYASHI et al., 2000).

17 A imunidade tumoral relaciona-se com a presença de células tumorais que  
18 expressam antígenos que as distinguem das células normais, ou seja, os tumores  
19 estimulam respostas específicas, são cercados de infiltrados de células  
20 mononucleares compostos pelos linfócitos T, NK e de macrófagos que induzem uma  
21 resposta imune contra essas células tumorais (ABBAS; LICHTMAN, 2015).

22 O sistema imune reconhece as células modificadas através das células  
23 apresentadoras de antígenos (APC) e recruta células pró-inflamatórias iniciando um  
24 processo de inflamação ao redor do tumor para uma possível eliminação. Em um  
25 segundo momento, algumas células evadem a esse ataque, permanecendo em um  
26 estado de pouca imunogenicidade, o que caracteriza a evasão tumoral (PARSLOW,  
27 2008).

28 A imunidade inata contra tumores envolve vários fenômenos, entre eles uma  
29 variedade de células, fatores humorais e respostas de tecidos. Com relação à  
30 variedade de células, destacam-se nesse processo os macrófagos e as células NK.  
31 Dentre elas, a mais efetora para o combate as células tumorais são as células  
32 *Natural Killer* (NK). A ativação dessas células depende do equilíbrio entre os seus  
33 receptores de ativação e inibição. As células tumorais, a expressão reduzida ou  
34 alterada das moléculas do CHP I interrompem os sinais inibitórios e, assim, permite



1 a ativação das células NK e a liberação de grânulos tóxicos de perforina e granzima,  
2 causando a lise das células-alvo. (TORREZINI; ATHANÁZIO, 2008).

3 Já os macrófagos também são importantes pela capacidade de estimular uma  
4 resposta imunológica. Eles realizam a destruição das células tumorais, quando  
5 ativados na sua forma clássica (M1), através da liberação de enzimas tóxicas, como  
6 as enzimas lisossomais, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, e são  
7 responsáveis pela produção do estimulador da toxidade tumoral, o TNF- $\alpha$ , e das  
8 citocinas que estimulam a resposta do sistema imune (IL-2, IL-12 e IL-18). Por outro  
9 lado, eles podem agir a favor do tumor através da forma ativada (M2), contribuindo  
10 para o seu crescimento, pois secretam fator de crescimento endotelial vascular  
11 (VEGF), e fator de transformação do crescimento-beta (TGF- $\beta$ ) e promovem a  
12 angiogênese tumoral (ABBAS; LICHTMAN, 2015; PARSLOW, 2004; ONUCHIC;  
13 CHAMMAS, 2010).

14 A imunidade adaptativa contra tumores envolve os linfócitos T,  
15 especificamente o T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) e os linfócitos B. Os linfócitos T citotóxicos  
16 reconhecem antígenos tumorais específicos expressos por moléculas do CHP-I  
17 (ABBAS; LICHTMAN, 2015). A redução na expressão do CHP-I ou a não expressão  
18 das moléculas de CHP-I é considerado um dos mecanismos de evasão tumoral  
19 (TORREZINI; ATHANÁZIO, 2008).

20 Já os linfócitos B participam da resposta antitumoral produzindo anticorpos  
21 específicos para esses tumores. Os anticorpos se ligam a antígenos facilitando o  
22 reconhecimento e a fagocitose com a destruição pelas células NK e ativação do  
23 sistema complemento para que ocorra a lise da célula tumoral (ONUCHIC;  
24 CHAMMAS, 2010).

25 O sistema imune tem papel muito importante diante das células tumorais para  
26 que não haja crescimento do tumor, pois as células tumorais criam um ambiente  
27 imunossupressor com a liberação de TGF- $\beta$ , afetando a resposta imune local. Em  
28 pacientes com estágios de cânceres avançados, a resposta imune está suprimida,  
29 com diminuição das respostas de células T CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup> e a deficiente  
30 expressão de moléculas de CHP nas células tumorais (PAZ et al., 2014).

31

32

### 1 1.3.1 Citocinas

2  
3 Citocinas são moléculas proteicas, glicolisadas ou não, de sinalização celular  
4 (estimulatório, modulatório ou mesmo inibitório) (VARELLA; FORTES, 2001). São  
5 polipeptídeos produzidos em resposta a micro-organismos e outros antígenos, que  
6 medeiam e regulam as reações imunológicas e inflamatórias. (MESQUITA JUNIOR  
7 et al., 2010; ABBAS; LICHTMAN, 2015). Embora as citocinas sejam estruturalmente  
8 diferentes, algumas possuem propriedades semelhantes. A secreção das citocinas é  
9 um evento breve e autolimitado, pois os RNAs que as codificam são instáveis. Elas  
10 possuem ações pleiotrópicas (uma citocina pode agir em diferentes tipos celulares) e  
11 redundantes (citocinas diferentes podem possuir o mesmo efeito funcional). Podem  
12 agir, ainda, de forma antagônica (citocinas inibindo o efeito de outra) e sinérgica  
13 (duas ou mais citocinas potencializando seus efeitos) (MESQUITA JUNIOR et al.,  
14 2010). Possuem também funções de crescimento e diferenciação de linfócitos (fase  
15 de ativação); ativação das células efectoras (imunidade inata e adquirida) e o  
16 desenvolvimento de células hematopoiéticas. (ABBAS; LICHTMAN, 2015).

17 As células T CD4<sup>+</sup> (T *helper*) foram inicialmente divididas em dois tipos, Th1 e  
18 Th2, de acordo com o perfil de citocinas que produzem. As células Th1 secretam,  
19 entre outras, IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), enquanto as células Th2  
20 produzem, entre outras, IL-4, IL-5 e IL-10. As células Th1 estão relacionadas à  
21 imunidade celular, enquanto as células Th2 possuem associação com resposta  
22 humoral e com a resposta alérgica (JANEWAY et al., 2007; ABBAS; LICHTMAN,  
23 2015).

24 A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória produzida por monócitos, células  
25 dendríticas e células B. As funções principais incluem a indução da produção de  
26 IFN- $\gamma$  pelas células NK e células T, o que melhora a capacidade citotóxica das  
27 células NK e das células T citotóxicas, além de atuar na diferenciação das células T  
28 naive em efetores Th1, sugerindo um papel importante no desenvolvimento da  
29 imunidade mediada por células (GEE et al., 2009).

30 A IL-10 é uma citocina potente na inibição das respostas inflamatórias e  
31 imunológicas, pois inibe a produção de IL-12 e TNF pelos macrófagos ativados e  
32 também inibe a expressão coestimuladora das moléculas do CHP de classe II

1 (inibindo a ativação das células T e as reações imunes imediatas) (SARAIVA;  
2 O'GARRA, 2010).

3 O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória secretada  
4 por macrófagos ativados e está envolvida em uma gama de processos biológicos,  
5 incluindo a proliferação celular, a diferenciação e a apoptose (PARSLOW, 2004).

6 O TGF- $\beta$ , um fator de crescimento que promove diferentes respostas  
7 biológicas, é secretado por células T antígeno-estimuladas por fagócitos ativados  
8 pelos lipopolisacarídeos (LPS). Tem como principal função inibir a proliferação e a  
9 diferenciação de linfócitos T e a ativação dos macrófagos. Por esse efeito inibitório,  
10 podem contribuir para a evolução tumoral (KIMURA; MATSUO; RICARTE-FILHO,  
11 2007; PARSLOW, 2004; ABBAS; LICHTMAN, 2015). São capazes de modular a  
12 proliferação celular e a expressão de genes em diversas células. Inibem a  
13 proliferação de células epiteliais, podendo, assim, inibir ou estimular a diferenciação  
14 celular, além de ser considerado fator angiogênico (KIMURA; MATSUO; RICARTE-  
15 FILHO, 2007).

16 A IL-2, uma interleucina com numerosas funções, pode estimular a  
17 diferenciação das células T no subconjunto Th1, além de ser importante na  
18 sobrevivência e manutenção dessas células. Além disso, ativa o fator de transcrição  
19 STAT 5 (*signal transducer and activator of transcription*), que pode aumentar a  
20 expressão de FoxP3 (*forkehead box p3*) e de outros genes envolvidos no  
21 funcionamento das células T regulatórias. Consegue, ainda, mediar a proliferação de  
22 células B e a síntese de imunoglobulinas (ABBAS; LICHTMAN, 2015; SON et al.,  
23 2010).

24 A IL-4 é conhecida por definir o perfil Th2 das células T, pois ativa o fator de  
25 transcrição STAT 6 que, juntamente com os sinais via receptor de células T (TCRs),  
26 induz a expressão de GATA 3 (*zinc-finger transcription factor*). Também é  
27 responsável pela apoptose e expressão de numerosos genes em algumas células,  
28 como linfócitos, macrófagos e fibroblastos (LUZINA et al., 2012; ABBAS;  
29 LICHTMAN, 2015).

30 O interferon (IFN), citocina secretada por células da imunidade inata, é capaz  
31 de mediar o início da resposta imune frente a uma infecção viral. Existem vários  
32 tipos de IFN sendo os mais importantes na defesa antiviral o IFN- $\alpha$ , o IFN- $\beta$  e o IFN-  
33  $\gamma$  (ABBAS; LICHTMAN, 2015).

1 O IFN- $\alpha$  é secretado pelas células dendríticas plasmocitoides e por fagócitos  
2 mononucleares. Já o IFN- $\beta$  é secretado por vários tipos celulares após uma infecção  
3 viral. Ambos os IFNs exercem funções importantes no organismo, entre elas indução  
4 de resistência à replicação viral através da ativação de genes celulares que  
5 destroem o RNAm (RNA mensageiro), inibindo, assim, a tradução da proteína viral e  
6 de parte da proteína do hospedeiro. Outra função refere-se à capacidade de induzir  
7 a expressão de CHP de classe I na maioria dos tipos celulares, aumentando sua  
8 resistência a células NK. Eles podem, também, induzir um aumento na síntese de  
9 CHP de classe I nas células que foram recém- infectadas por um vírus, tornando  
10 essas células recém- infectadas mais susceptíveis à ação das células T CD8  
11 citotóxicas. Os interferons também são capazes de ativar as células NK, que matam  
12 as células infectadas pelo vírus (ABBAS; LICHTMAN, 2015; JANEWAY et al., 2007).

13 O IFN- $\gamma$  é secretado por células T no perfil Th1 e, por isso, ele é responsável  
14 pela diferenciação desse perfil, inibindo a diferenciação das células T no perfil Th2 e  
15 Th17 e polarizando a resposta imune em uma única direção (ABBAS; LICHTMAN,  
16 2015; JANEWAY et al., 2007).

17

#### 18 1.4 LESÕES DO COLO UTERINO E RESPOSTA IMUNE

19

20 O sistema imune confere uma proteção do organismo contra uma ampla  
21 variedade de patógenos e tem uma importante função na resposta do organismo às  
22 células neoplásicas, sendo capaz de integrar vários tipos celulares e proteínas  
23 contra a invasão de patógenos (NICOL et al., 2008).

24 A resposta imune tem um importante papel na infecção da cérvix uterina  
25 pelo HPV, tanto relacionado à persistência viral como no próprio desenvolvimento do  
26 câncer de colo uterino, visto que algumas citocinas são importantes na regulação da  
27 transcrição do vírus (SONG et al., 2008; AZAR et al., 2004; KYO et al., 1994).

28 O mecanismo que promove o desenvolvimento do tumor na cérvix uterina é  
29 complexo e inclui a desregulação de vias de sinalização desencadeada pela  
30 liberação de citocinas frente à presença do vírus nas células cervicais (BURD,  
31 2003).

32 Nos estágios iniciais do câncer de colo uterino, o TGF- $\beta$  atua como um  
33 supressor tumoral, pois impede a divisão celular ao atuar na fase G1 pela *down*

1 *regulation* de algumas proteínas que, por sua vez, atuam na cascata de sinalização  
2 do TGF- $\beta$ . Já nos estágios mais avançados do câncer cervical, a sinalização de  
3 TGF- $\beta$  é capaz de promover invasão e metástase através da indução de fatores de  
4 transcrição que causam diferenciação no epitélio da cérvix uterina (PEINADO;  
5 QUINTANILLA; CANO, 2003).

6 Maehara et al. (1999) e Desruisseau et al. (1996) relatam que, durante a  
7 tumorigênese, o TGF- $\beta$  é responsável por estimular atividades proteolíticas do  
8 tecido tumoral e um aumento na expressão e nos níveis dessa citocina resulta em  
9 carcinoma invasivo e metástases. Geralmente, o TGF- $\beta$ 1 é produzido em  
10 quantidades basais no epitélio do colo uterino normal. Mas sua produção é gradual e  
11 intensa quando se tem a progressão da lesão de LSIL para o câncer de colo uterino  
12 e a expressão dessa citocina mantém-se constante quando se compara pacientes  
13 com LSIL e HSIL enquanto que entre HSIL e câncer de colo ela aumenta  
14 significativamente (SOUFLA et al., 2005).

15 A IL-4 e IL-10 são citocinas imunossupressoras que caracterizam o perfil  
16 Th2 e, segundo Clerici, Shearer e Clerici (1998) e Sheu et al. (2001), a expressão  
17 dessas duas citocinas está correlacionada com a gravidade da doença, ou seja, a  
18 medida que aumenta o grau da lesão, ocorre um aumento significativo da expressão  
19 dessas citocinas e favorece a imunossupressão no local da lesão, o que está  
20 associado à desregulação de várias moléculas da resposta imune.

21 A IL-10 pode ter como função dentro da biologia do tumor um efeito  
22 pleiotrópico complexo, sendo capaz de aumentar ou diminuir a imunogenicidade  
23 tumoral. Em LSIL e HSIL, a IL-10 encontra-se elevada e, por isso, acredita-se que  
24 ela altere os mecanismos de imunovigilância, sendo favorável às transformações  
25 neoplásicas, permitindo, assim, a progressão das lesões. (AZAR et al., 2004; BAIS  
26 et al., 2007). No entanto, a IL-10 não é sempre imunossupressora e promotora da  
27 evasão tumoral, pois alguns estudos demonstraram que a expressão de IL-10  
28 permaneceu semelhante em mulheres com lesões no colo uterino e em mulheres  
29 saudáveis (ZOODSMA et al., 2005).

30 A IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são citocinas relacionadas ao perfil Th1. A IL-2  
31 encontra-se reduzida no soro periférico de mulheres de acordo com a severidade da  
32 lesão cervical e em mulheres com o câncer invasor. E o IFN- $\gamma$  esteve reduzido no  
33 soro periférico de pacientes com câncer de colo uterino (SCOTT; NAKAGAWA;  
34 MOSCICKI, 2001; SHARMA et al., 2007). Segundo Tartour et al. (1994), baixos

1 níveis de IFN- $\gamma$  foram associados ao desenvolvimento do câncer cervical e com o  
2 pior prognóstico. A IL-12 e o TNF- $\alpha$  encontram-se mais elevados em pacientes com  
3 câncer cervical em relação a pacientes com LSIL e HSIL, de acordo com um  
4 trabalho feito por Tjiong et al. (2001), quando foram feitas análises dessas citocinas  
5 no lavado cérvico vaginal de mulheres com lesão intraepitelial e câncer cervical.

6 Muitos estudos sugerem que o padrão Th1 está relacionado com o  
7 desenvolvimento do câncer cervical quando associado ao HPV e que o padrão Th2  
8 está associado à persistência da infecção viral e o desenvolvimento da neoplasia  
9 (WU; KURMAN, 1997; FARZANEH et al., 2006).

10

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

*Justificativa*

29  
30

## 1 **2 JUSTIFICATIVA**

2

3           As citocinas possuem um papel importante na imunidade e na carcinogênese.

4 A produção de citocinas dentro do microambiente tumoral está relacionada a uma  
5 resposta imune efetiva contra as células malignas (SON et al., 2010). Considerando  
6 que o melhor entendimento do papel das citocinas no desenvolvimento das  
7 neoplasias cervicais teria importantes implicações nas terapias imunes e nas  
8 estratégias de vacinação, o estudo do padrão de citocinas no soro e na secreção  
9 cervical permitiria esse entendimento do padrão de citocinas presentes tanto no  
10 microambiente tumoral quanto na circulação sistêmica. Além disso, tão importante  
11 quanto entender estes mecanismos, seria detectar um padrão destes mediadores na  
12 secreção ou no soro como um possível marcador de progressão da lesão.

13



- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30

# *Objetivos*

### 1 **3 OBJETIVOS**

2

#### 3 **3.1 OBJETIVO GERAL**

4

5 Avaliar o perfil de citocinas (TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) no  
6 soro e na secreção endocervical de mulheres com lesão de baixo, alto grau e o  
7 câncer cervical invasor.

8

#### 9 **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

10

11 Comparar a concentração de citocinas (TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e  
12 TNF- $\alpha$ ) presentes na secreção endocervical e no soro de cada paciente.

13 Determinar uma possível correlação de produção de citocinas séricas e na  
14 secreção endocervical nos diferentes tipos de lesões.

15

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

# *Materiais e métodos*

29  
30

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 PACIENTES

Trata-se de um estudo prospectivo realizado com 100 pacientes atendidas no Ambulatório Maria da Glória – UFTM, no período de 2013 a 2017. Todas as pacientes foram rastreadas por citologia cervicovaginal, colposcopia e para confirmação do diagnóstico para lesão de baixo grau, lesão de alto grau ou câncer cervical invasor por exame histopatológico. O projeto foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sob protocolo número 683-2006 (Anexo A).

### 4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios para a inclusão das mulheres na pesquisa foram:

- Mulheres no período reprodutivo;
- Mulheres menores de 18 anos, sendo autorizada pelo seu responsável.
- Mulheres diagnosticados com lesão intraepitelial de baixo grau, alto grau e câncer cervical.

### 4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios para a exclusão das mulheres na pesquisa foram:

- Mulheres em estado terminal intensamente imunossuprimidos;
- Mulheres com outras doenças imunossupressoras;
- Mulheres ainda sobre tratamentos convencionais como quimioterapia e radioterapia;
- Mulheres gestantes;
- Mulheres fumantes;
- Mulheres que já foram submetidas ao tratamento com interferon.

#### 1 4.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

2  
3 A secreção endocervical foi coletada de todas as pacientes selecionadas por  
4 um profissional médico responsável pelo serviço de Ginecologia e Obstetrícia do  
5 Hospital de Clínicas – UFTM.

6 Para a realização do procedimento, foi realizada a exposição do colo uterino  
7 com a introdução de um espéculo vaginal sem a utilização de lubrificante. Foi  
8 introduzida uma escovinha no orifício endocervical e com movimentos giratórios de  
9 360° realizou a coleta do material na endocervix. A escovinha contendo a secreção  
10 endocervical foi, então, colocada em um tubo contendo 0,5 mL de soro fisiológico  
11 (SF 0,9%) e sua haste foi cortada para que o tubo fosse fechado. O tubo contendo a  
12 escova com a secreção foi agitado em um *vortex* por 1 minuto, sendo então invertido  
13 e realizado um orifício na parte inferior. Com cuidado o mesmo foi encaixado em  
14 outro tubo e estes foram submetidos à centrifugação por 5 minutos a 300 rpm. Após  
15 a centrifugação, o tubo superior foi descartado e o material foi estocado a -80°C para  
16 as dosagens das citocinas.

17 O sangue periférico das mulheres incluídas no estudo foi colhido por punção  
18 venosa, em volume de 10mL e colocados em tubos de ensaio estéreis Vacutainer  
19 (Beckton Dickinson, Rutherford, NJ, USA). O tubo foi centrifugado a 2100 rpm por 10  
20 minutos à temperatura ambiente. O soro obtido foi armazenado em alíquotas a -80  
21 °C.

#### 22 23 4.5 QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS POR ELISA

24  
25 As citocinas presentes na secreção endocervical e no soro foram dosadas por  
26 ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) sanduíche com a utilização de  
27 pares de anticorpos monoclonais disponíveis comercialmente pela BD OptEIA™.

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

32 Foram dosadas as concentrações das citocinas (TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-2, IL-  
33 12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ). Todos os procedimentos seguiram protocolos e normas técnicas  
34 fornecidas pelo fabricante, como preparo das soluções tampão e lavagens, curvas

1 padrões e incubações e, por fim, leitura no espectrofotômetro de acordo com a  
2 metodologia descrita abaixo.

#### 3 4 **4.5.1 Metodologia para dosagens das citocinas**

5  
6 a) Antes da análise das secreções e do soro, cada placa foi sensibilizada com  
7 os respectivos anticorpos de captura correspondentes a cada citocina citada  
8 anteriormente. Para esta sensibilização, foram pipetados 25µL do anticorpo de  
9 captura, diluídos na proporção (1:250) em solução tampão “Coating Buffer”  
10 (Carbonato de sódio – Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1M), obedecendo assim a recomendação  
11 especificada pelo fabricante e sendo suficientes para adsorver nos poços da placa.  
12 Após esse procedimento, cada placa foi incubada *overnight* a 4° C.

13 b) No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem  
14 *Wash Buffer* (PBS/Tween 20 a 0,05%), de forma a deixar os anticorpos aderidos nas  
15 superfícies de cada poço da placa.

16 c) Foram, então, pipetados 50µL em cada poço da placa de uma solução de  
17 bloqueio contendo PBS e SBF (Soro Bovino Fetal 10%), com o objetivo de bloquear  
18 as áreas onde os anticorpos não aderiram na placa (sítios inespecíficos). A placa foi,  
19 então, tampada e incubada por 1 hora a temperatura ambiente.

20 d) Após este período de incubação, foi feita a lavagem da placa (PBS/Tween  
21 20 a 0,05%) três vezes. Em seguida, foi realizada a diluição seriada do padrão  
22 recombinante para composição da curva padrão. A tabela 1 apresenta a  
23 concentração inicial conhecida para cada citocina. A diluição do padrão  
24 recombinante foi realizada em *Assay Diluent* (PBS/FBS-10%).

25 e) As soluções padrões foram, então, pipetadas (25µL) nos oito primeiros  
26 poços das duas fileiras iniciais da placa (em duplicata). Em seguida, foram pipetados  
27 também 25µL das amostras seguindo a numeração de cada paciente bem como a  
28 ordem numérica das aplicações, totalizando 100 pacientes e tendo cada uma, duas  
29 amostras sendo uma da secreção endocervical e a outra do soro. Todas as  
30 amostras das pacientes foram pipetadas sequencialmente seguindo as ordens dos  
31 poços e fileiras da placa.

**Tabela 1** – Valores de concentração inicial em pg/mL das citocinas para início da curva padrão.

Citocinas	Valor de concentração inicial da curva padrão (pg/mL)
IL-2	100
IL-12	110
IL-10	26
IFN- $\gamma$	100
TNF- $\alpha$	132
TGF- $\beta$	8000
IL-4	500

1

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

4 g) Após este período, a placa foi, então, lavada por cinco vezes  
5 (PBS/Tween20 a 0,05%) e foram pipetados a seguir 25 $\mu$ L de anticorpo de detecção  
6 (conjugado – Biotina/Streptavidina-HRP) diluído (PBS/FBS-10%) específicos para  
7 cada citocina. Em seguida a placa foi mais uma vez tampada e incubada por uma  
8 hora em temperatura ambiente.

9 h) Após uma hora de incubação as placas foram lavadas cinco vezes  
10 (PBS/Tween20 a 0,05%) e em seguida foi realizado a reação de coloração, sendo  
11 pipetados 25 $\mu$ L do substrato cromógeno TMB (tetrametilbenzidina) em cada poço da  
12 placa (padrões e amostras). Então, a placa foi tampada e incubada mais uma vez  
13 por 30 minutos em local protegido da luz.

14 i) Após esse período de incubação, foi adicionado 12,5 $\mu$ L de ácido fosfórico  
15 1,0 M para interromper as reações.

16 j) A placa foi então analisada em um leitor de ELISA automático  
17 Spectramax384 Plus e os resultados foram obtidos pela diferença entre as  
18 absorbâncias 450 e 570 nm, respectivamente.

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

21

## 1 4.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

2

3 Os resultados obtidos das citocinas foram tabulados utilizando o Microsoft  
4 Excel. As variáveis analisadas através do programa GraphPadPrism 6.0 utilizando  
5 teste de Mann Whitney com  $p < 0,05$  como significante, e teste de Correlação de  
6 Pearson com valores de  $r^2$ , considerando uma correlação fraca valores  $< 0,5$ ;  
7 moderada  $0,5$  a  $0,7$ ; forte  $0,7$  a  $0,9$  e muito forte  $> 0,9$ .

8



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

# *Resultados*

1 **5 RESULTADOS**

2

3 Foram dosadas as citocinas TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  em  
4 amostras de secreção endocervical e soro periférico de 100 pacientes com os  
5 diagnósticos de lesão intraepitelial e câncer cervical invasivo, sendo que 15% das  
6 pacientes (n=15) foram diagnosticadas com câncer cervical invasivo em  
7 estadiamento II-IV, 45% (n=45) LSIL e 40% (n=40) com HSIL.

8

**Tabela 2** – Identificação da idade e caracterização do comportamento sexual das pacientes nos grupos LSIL, HSIL e Câncer cervical, dados coletados nos prontuários das pacientes.

<b>Dados Gerais</b>	<b>LSIL</b>	<b>HSIL</b>	<b>Câncer</b>
<b>Idade</b>			
Mediana (mínimo-máximo)	25 (15-58)*	33 (18-71)*	51 (28-76)
<b>1ª relação sexual (anos)</b>			
Mediana (mínimo-máximo)	16 (11-31)	16 (12-25)	17 (13-20)
<b>Nº de Parceiros</b>			
Mediana (mínimo-máximo)	2 (1-10)	2 (1-10)	2 (1-7)
<b>1ª gestação (anos)</b>			
Mediana (mínimo-máximo)	18 (14-38)	17,5 (12-34)	18 (13-24)
<b>Nº de Gestação</b>			
Mediana (mínimo-máximo)	1 (0-8)*	2 (0-7)	4 (0-12)
<b>Nº de Partos</b>			
Mediana (mínimo-máximo)	1 (0-8)	2 (0-8)*	3 (0-12)
<b>Nº de Aborto</b>			
Mediana (mínimo-máximo)	0 (0-4)	0 (0-2)	0 (0-1)
<b>Uso de ACO</b>			
n (%)	22 (49%)	21 (52,5%)	5 (26,7%)

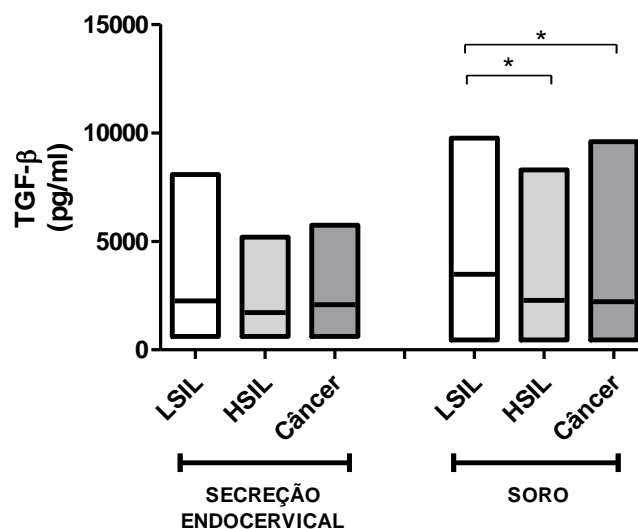
9 Nota: \*p<0,05 vs grupo Câncer; teste Mann Whitney, pós teste de Dunn. ACO:  
10 anticoncepcional oral.

11

1            Informações nos prontuários das pacientes sobre idade, paridade, idade da  
 2 primeira relação sexual, idade da primeira gestação, número de parceiros e uso de  
 3 anticoncepcional oral (ACO) foram também levantadas conforme tabela 2, na qual  
 4 se observa que a mediana de idade foi de 25 anos no grupo LSIL, 33 anos para o  
 5 grupo HSIL e 51 anos para o grupo com câncer cervical. A idade da primeira relação  
 6 sexual, número de parceiros, idade da primeira gestação e paridade apresentaram  
 7 mediana semelhante. Quanto ao uso de anticoncepcional oral, o grupo LSIL e HSIL  
 8 apresentaram valores aproximados de porcentagem com 49% e 52,5%,  
 9 respectivamente, já no grupo com câncer cervical, 26,7% das pacientes faziam o  
 10 uso de anticoncepcional oral.

11

12 **Figura 1** – Dosagem da citocina TGF- $\beta$  no soro periférico e na secreção endocervical de pacientes  
 13 com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical. **A concentração de TGF- $\beta$  manteve-se**  
 14 **semelhante na análise na secreção endocervical e apresentou-se elevada no soro periférico de**  
 15 **paciente com LSL.** O TGF- $\beta$  foi dosado na secreção endocervical e no soro periférico através do  
 16 método de ELISA e a análise estatística dos dados por Mann Whitney. Observa-se significância na  
 17 concentração de TGF- $\beta$  no soro periférico entre os grupos LSIL e HSIL com  $p=0,0303$  (\*), e entre os  
 18 grupos LSIL e câncer cervical invasivo com  $p=0,0451$  (\*). LSIL (lesão intraepitelial de baixo grau),  
 19 HSIL (lesão intraepitelial de alto grau).



20

21

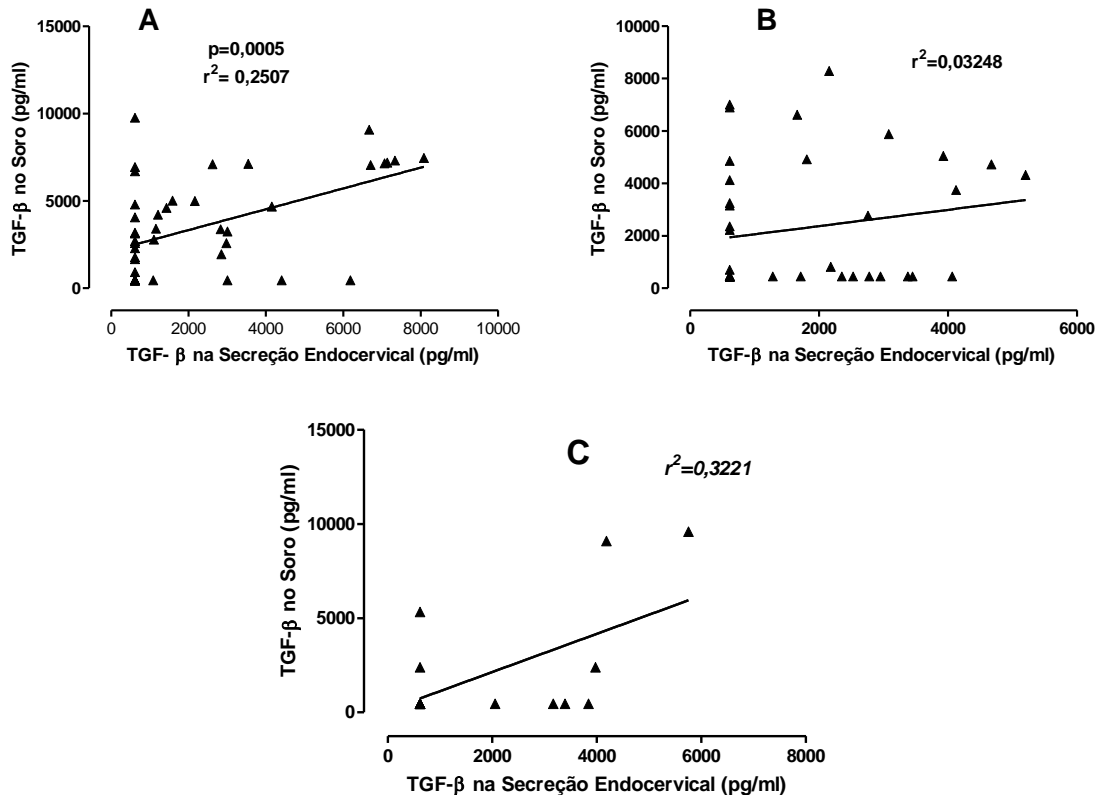
22            A figura 1 representa a dosagem de TGF- $\beta$  na secreção endocervical e no  
 23 soro periférico em pacientes com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical  
 24 invasivo. Com relação à secreção endocervical, observa-se que dosagem de TGF- $\beta$   
 25 manteve-se na mesma concentração quando analisamos os grupos estudados. Já  
 26 na concentração do soro periférico, percebe-se um aumento de TGF- $\beta$  no grupo de  
 27 pacientes com diagnóstico de LSIL. Houve significância estatística quando se

1 compara o grupo LSIL com HSIL com  $p=0,0303$  e no grupo LSIL com o grupo com  
 2 câncer cervical invasivo sendo o valor de  $p=0,0451$ . Quanto à dosagem de secreção  
 3 endocervical e o soro periférico no mesmo grupo, houve significância no grupo com  
 4 câncer cervical invasivo com  $p=0,0363$ .

5 Na figura 2 é possível verificar a correlação de TGF- $\beta$  na secreção  
 6 endocervical e no soro periférico de pacientes com diagnóstico de LSIL, HSIL e  
 7 câncer cervical invasivo. No grupo de pacientes com LSIL observa-se que algumas  
 8 pacientes apresentaram essa citocina aumentada, tanto na secreção endocervical  
 9 quanto no soro periférico, tendo valor significativo de  $p=0,0005$  Já no grupo HSIL  
 10 observa-se que muitas pacientes apresentaram níveis de TGF- $\beta$  maior na secreção  
 11 endocervical quando comparado com o soro periférico. No grupo com LSIL tem-se  
 12 valores estatísticos com  $p=0,0005$ .

13

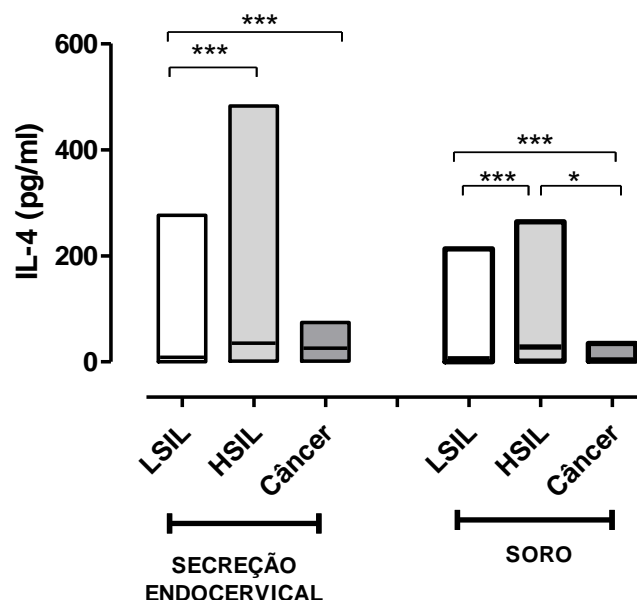
14 **Figura 2 –** Correlação por grupos da dosagem de TGF- $\beta$  na secreção endocervical e soro periférico  
 15 nos grupos de pacientes com diferentes diagnósticos: (A) LSIL; (B) HSIL; (C) câncer cervical invasivo.  
 16 **Nos três grupos observa-se uma distribuição semelhante de TGF- $\beta$ , com predomínio maior na**  
 17 **secreção endocervical.** Houve significância estatística no grupo de pacientes com LSIL com  
 18  $p=0,0005$ . Os três grupos apresentaram uma correlação fraca.



1 A figura 3 mostra a dosagem da citocina IL-4 na secreção endocervical e no  
 2 soro periférico de pacientes com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical  
 3 invasivo. O grupo HSIL apresentou uma dosagem maior de IL-4 na secreção  
 4 endocervical e no soro periférico em relação aos outros dois grupos (LSIL e câncer  
 5 cervical invasivo). Ao comparar a concentração de IL-4 na secreção endocervical  
 6 entre os grupos, observa-se significância estatística entre os grupos LSIL e HSIL  
 7 com  $p < 0,0001$  e entre os grupos LSIL e câncer invasivo com o  $p < 0,0001$ . Ao  
 8 analisar a concentração de soro periférico entre os grupos encontra-se significância  
 9 estatística entre os grupos LSIL e HSIL com  $p < 0,0001$ , entre os grupos HSIL e  
 10 câncer invasivo com  $p = 0,0323$  e entre os grupos LSIL e câncer invasivo com valor  
 11 de  $p < 0,0001$ .

12

13 **Figura 3 –** Dosagem da citocina IL-4 no soro periférico e na secreção endocervical de pacientes com  
 14 diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical. **Pacientes com HSIL apresentam concentração**  
 15 **elevada de IL-4 tanto na secreção endocervical quanto no soro periférico.** IL-4 foi dosada na  
 16 secreção endocervical e no soro periférico através do método de ELISA, e análise dos dados por  
 17 Mann Whitney. Observa-se significância estatística entre os grupos LSIL e HSIL com  $p < 0,0001$  (\*\*\*) e  
 18 entre os grupos LSIL e câncer invasivo com o  $p < 0,0001$  (\*\*\*) quando se analisa a secreção  
 19 endocervical. Já a concentração de IL-4 no soro periférico encontra-se significância estatística entre  
 20 os grupos LSIL e HSIL com  $p < 0,0001$  (\*\*\*) , entre os grupos HSIL e câncer invasivo com  $p = 0,0323$  (\*)  
 21 e entre os grupos LSIL e câncer invasivo com valor de  $p < 0,0001$  (\*\*\*) . LSIL (lesão intraepitelial de  
 22 baixo grau), HSIL (lesão intraepitelial de alto grau).



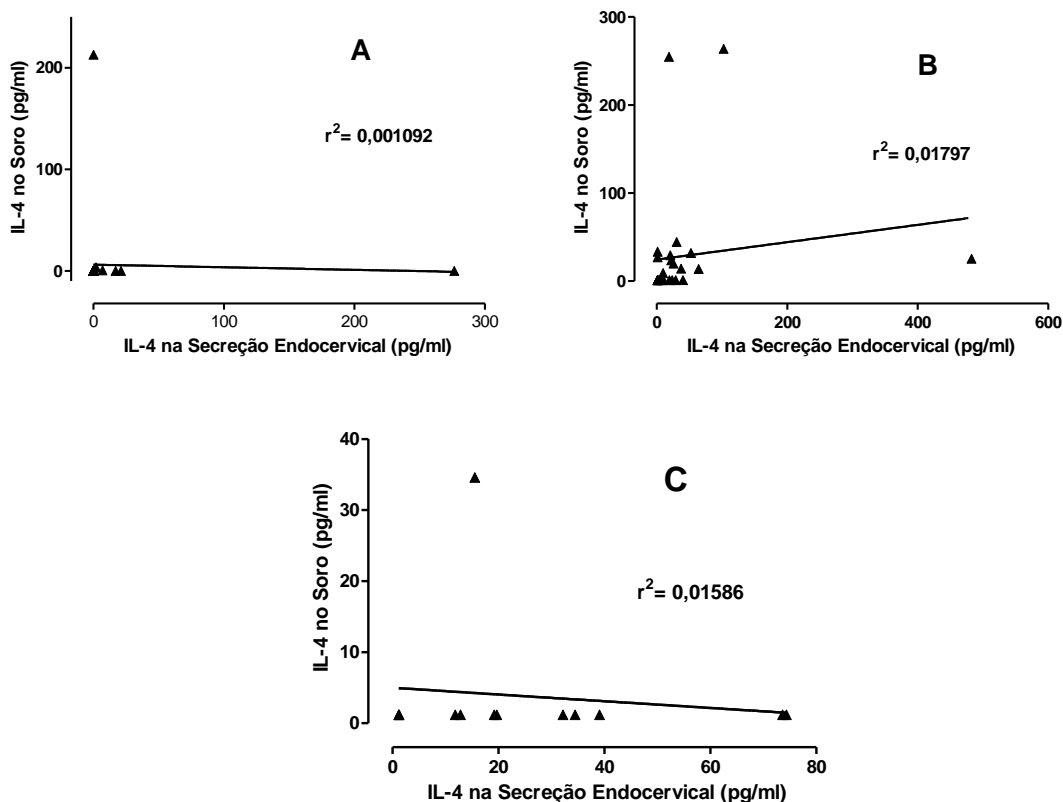
23

24 A figura 4 representa a correlação da dosagem de IL-4 na secreção  
 25 endocervical e no soro periférico nos grupos estudados. Na figura 4A, observa-se  
 26 que a dosagem de IL-4 na secreção endocervical e no soro periférico de pacientes

1 com LSIL manteve-se com níveis baixos com uma tendência a se manter constante  
 2 e correlação de Pearson fraca ( $r^2= 0,001092$ ). Somente uma amostra apresentou  
 3 concentração de IL-4 maior na secreção endocervical quando comparada com a  
 4 concentração no soro periférico. Na figura 4B, nota-se um predomínio da  
 5 concentração de IL-4 no soro periférico enquanto que na secreção endocervical  
 6 baixa, com uma curva de tendência crescente, no entanto correlação de Pearson  
 7 fraca ( $r^2= 0,01797$ ). Algumas amostras apresentaram uma concentração maior de IL-  
 8 4 no soro periférico e uma amostra apresentou dosagem maior na secreção  
 9 endocervical. Na figura 4C, observa-se uma distribuição diferente da dosagem de IL-  
 10 4 nas pacientes com câncer cervical invasivo, pois se observa que a dosagem de IL-  
 11 4 na secreção endocervical é maior quando comparada com a dosagem no soro  
 12 periférico. Uma paciente apresentou valores altos de IL-4 no soro e na secreção  
 13 endocervical, com correlação de Pearson fraca ( $r^2= 0,01586$ ). De acordo com  
 14 análise estatística, não houve significância com esses resultados.

15

16 **Figura 4** – Correlação por grupos da dosagem de IL-4 na secreção endocervical e soro periférico nos  
 17 grupos de pacientes com diferentes diagnósticos: (A) LSIL; (B) HSIL; (C) câncer cervical invasivo.  
 18 **Nas pacientes com LSIL e HSIL, percebe-se um comportamento semelhante, com baixa**  
 19 **concentração de IL-4 tanto no soro periférico quanto na secreção endocervical.** Em  
 20 contrapartida, nas pacientes com câncer cervical, observa-se a presença de IL-4 na secreção  
 21 endocervical. Mas os três grupos apresentaram uma correlação fraca.



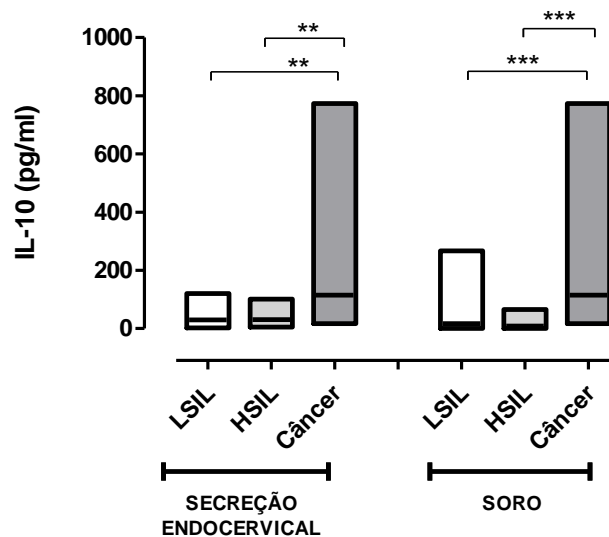
22

23

1 A figura 5 representa a dosagem de IL-10 na secreção endocervical e no soro  
 2 periférico de pacientes com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical invasivo. A  
 3 citocina analisada apresentou elevações maiores tanto na secreção endocervical  
 4 quanto no soro periférico no grupo com câncer cervical invasivo. Observa-se  
 5 relevância estatística entre a dosagem de IL-10 na secreção endocervical nos  
 6 grupos LSIL e câncer cervical invasivo com  $p=0,0014$ . Nos grupos HSIL e câncer  
 7 cervical invasivo, encontra-se valores estatísticos significativos com  $p=0,0039$ .  
 8 Quando se analisa a dosagem de IL-10 no soro periférico, observa-se relevância  
 9 significativa no grupo LSIL e câncer cervical invasivo com  $p<0,0001$ . Existe  
 10 relevância estatística quando se compara o grupo HSIL e câncer cervical uterino  
 11 com  $p<0,0001$ .

12

13 **Figura 5** – Dosagem da citocina IL-10 no soro periférico e na secreção endocervical de pacientes  
 14 com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical. **A concentração de IL-10 manteve-se elevada**  
 15 **tanto na secreção endocervical e quanto no soro periférico no grupo de mulheres com câncer**  
 16 **cervical invasivo.** A dosagem de IL-10 no soro periférico e na secreção endocervical foi realizada por  
 17 ELISA e a análise estatística por Mann Whitney. Observa-se significância estatística ao analisarmos a  
 18 secreção endocervical entre os grupos LSIL e câncer cervical invasivo com  $p = 0,0014$  (\*\*), entre os  
 19 grupos HSIL e câncer cervical com  $p=0,0039$  (\*\*). Com relação à dosagem no soro periférico,  
 20 observa-se significância entre LSIL e câncer cervical com  $p<0,0001$  (\*\*\*) e entre o HSIL e câncer  
 21 invasivo com  $p <0,0001$  (\*\*\*). LSIL (lesão intraepitelial de baixo grau), HSIL (lesão intraepitelial de alto  
 22 grau).



23

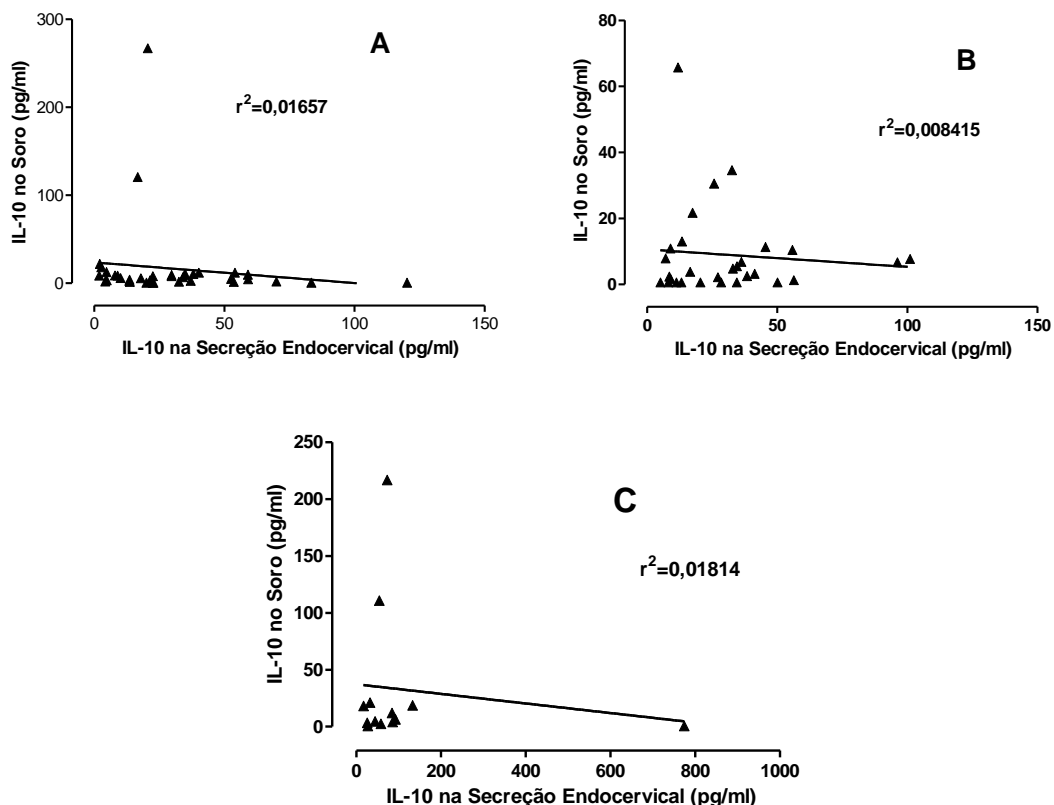
24

25 A figura 6 demonstra a correlação entre a dosagem de secreção IL-10 na  
 26 secreção endocervical e no soro periférico, sendo (A) grupo LSIL, (B) HSIL e (C)  
 27 câncer cervical invasivo. Na figura 6A, observa-se uma concentração de IL-10 na  
 28 secreção endocervical maior quando comparada com a concentração no soro

1 periférico no grupo com LSIL, algumas pacientes apresentaram uma concentração  
 2 maior de citocina no soro periférico quando comparada à dosagem na secreção  
 3 endocervical, com Correlação de Pearson fraca ( $r^2=0,01657$ ) A figura 6B demonstra  
 4 a correlação da dosagem de IL-10 no grupo HSIL, na qual se observa uma  
 5 concentração maior de IL-10 na secreção endocervical quando relacionada com a  
 6 concentração no soro periférico, Correlação de Pearson fraca ( $r^2=0,008415$ ) Na  
 7 figura 6C, que mostra a correlação na secreção e no soro periférico de pacientes  
 8 com câncer cervical invasivo, observa-se que concentração de IL-10 se encontra  
 9 baixa tanto no soro periférico quanto na secreção endocervical, Correlação de  
 10 Pearson fraca ( $r^2=0,01814$ ).

11

12 **Figura 6** – Correlação por grupos da dosagem de IL-10 na secreção endocervical e soro periférico  
 13 nos grupos de pacientes com diferentes diagnósticos: (A) LSIL; (B) HSIL; (C) câncer cervical invasivo.  
 14 **Observa-se uma expressão de IL-10 na secreção endocervical os grupos LSIL e HSIL com**  
 15 **valores de  $r^2=0,01657$  e  $r^2=0,008415$ , respectivamente. Entretanto, nos três grupos houve uma**  
 16 **correlação fraca.**



17

18

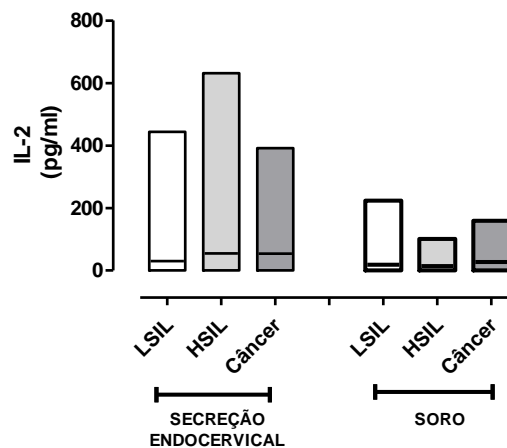
19

20 A figura 7 refere-se à dosagem de IL-2 na secreção endocervical e no soro  
 21 periférico de pacientes com LSIL, HSIL e câncer cervical. Constata-se, na análise  
 22 das dosagens de IL-2 na secreção endocervical, que os grupos HSIL e câncer



cervical apresentaram valores semelhantes e ambos estão aumentados em comparação com o grupo LSIL. Já no soro periférico, observa-se que os níveis de IL-2 se encontram diminuídos nos três grupos, sendo que o grupo do câncer cervical apresenta uma discreta elevação em relação aos demais grupos. Não houve diferença significativa em nenhum dos grupos estudados.

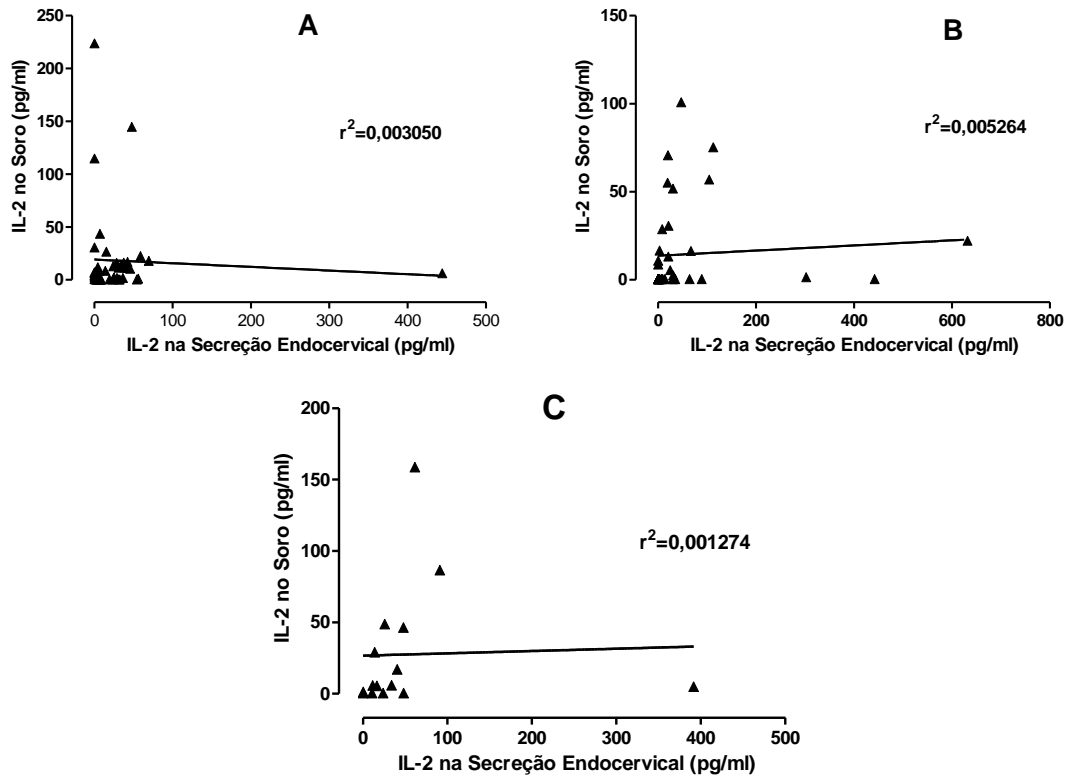
**Figura 7 –** Dosagem da citocina IL-2 no soro periférico e na secreção endocervical de pacientes com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical. **A concentração de IL-2 está elevada na secreção endocervical nos grupos HSIL e câncer cervical, já no soro há elevação no grupo com câncer cervical invasivo.** A dosagem de IL-2 no soro periférico e na secreção endocervical foi realizada por ELISA e a análise estatística por Mann Whitney. Não houve significância estatística. LSIL (lesão intraepitelial de baixo grau), HSIL (lesão intraepitelial de alto grau).



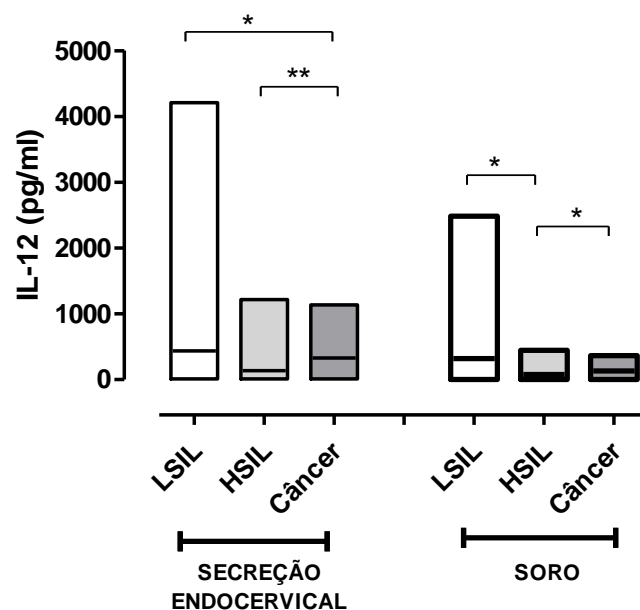
A figura 8 representa a correlação na dosagem de IL-2 existente na secreção endocervical e no soro periférico em pacientes com LSIL, HSIL e câncer cervical. Os três grupos mostram-se com um padrão semelhante da dosagem de IL-2, ou seja, uma baixa dosagem de IL-2 tanto na secreção endocervical quanto no soro periférico.

A figura 9 refere-se à dosagem de IL-12 na secreção endocervical e no soro periférico em pacientes com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical. Na análise da secreção endocervical, nota-se que concentração de IL-12 se manteve elevada nos grupos LSIL e câncer cervical, enquanto que no grupo HSIL permaneceu em menor concentração, com diferença estatística entre os grupos LSIL e câncer cervical ( $p=0,0347$ ) e entre os grupos HSIL e câncer cervical ( $p=0,0076$ ). Na análise do soro periférico, observa-se que a IL-12 permaneceu elevada no grupo LSIL, mas no grupo HSIL a concentração de IL-12 demonstrou-se a mais baixa quando se compara com os demais grupos. Houve diferença significativa entre os grupos LSIL e HSIL ( $p=0,0409$ ) e nota-se também diferença estatística entre os grupos HSIL e câncer cervical uterino ( $p=0,0317$ ).

1 **Figura 8** – Correlação por grupos da dosagem de IL-2 na secreção endocervical e soro periférico nos grupos  
 2 de pacientes com diferentes diagnósticos: (A) LSIL; (B) HSIL; (C) câncer cervical invasivo. **Observa-se uma**  
 3 **baixa dosagem de IL-2 tanto na secreção endocervical quanto no soro periférico, sendo uma**  
 4 **correlação fraca com valores de  $r^2=0,003050$  (LSIL);  $r^2=0,005264$  (HSIL) e  $r^2=0,001274$  (câncer).**

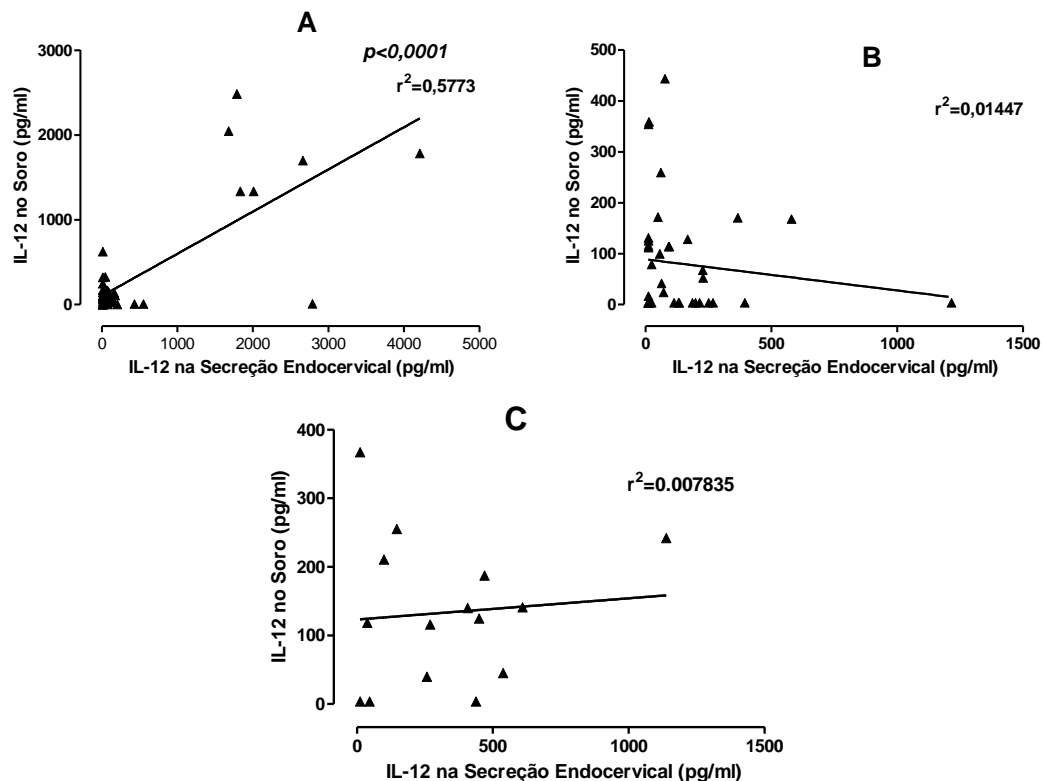


31 **Figura 9** – Representa a dosagem da citocina IL-12 no soro periférico e secreção endocervical de  
 32 pacientes com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical. **A IL-12 mostrou-se elevada tanto na**  
 33 **secreção endocervical quanto no soro periférico nos grupos LSIL e câncer cervical.** A dosagem  
 34 de IL-12 no soro periférico e na secreção endocervical foi realizada por ELISA e a análise estatística  
 35 por Mann Whitney. Ao analisar a dosagem na secreção endocervical, obteve significância estatística  
 36 entre os grupos LSIL e câncer cervical invasivo com  $p=0,0347$  (\*) e entre os grupos HSIL e câncer  
 37 cervical com  $p=0,0076$  (\*\*). Na análise do soro periférico houve significância estática entre os grupos  
 38 LSIL e HSIL com  $p=0,0409$  (\*) e entre os grupos HSIL e câncer cervical invasivo com  $p=0,0317$  (\*).  
 39 LSIL (lesão intraepitelial de baixo grau), HSIL (lesão intraepitelial de alto grau).



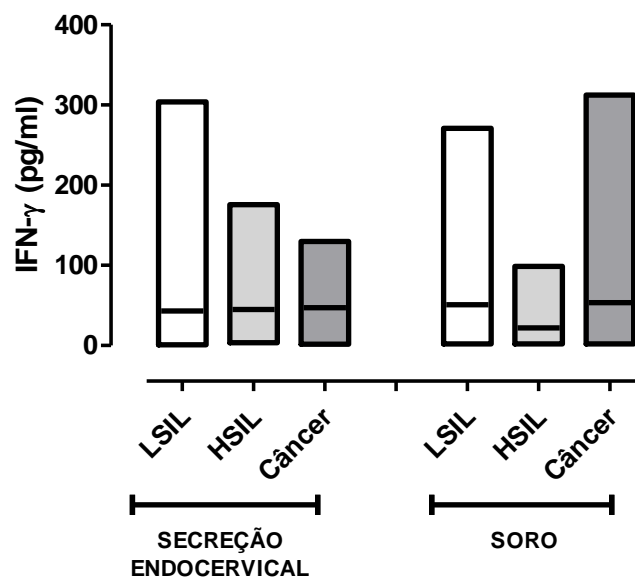
1  
2  
3 A figura 10 representa a correlação da dosagem de IL-12 no soro periférico e  
4 na secreção endocervical nos grupos de pacientes com LSIL, HSIL e câncer  
5 cervical. Na figura 10A, observa-se que a maioria das pacientes não expressou IL-12  
6 no soro periférico e na secreção endocervical, no entanto, algumas tiveram a  
7 expressão de IL-12 aumentada tanto no soro periférico quanto na secreção  
8 endocervical e com dados significativos ( $p < 0,0001$  e  $r^2 = 0,5773$ ), evidenciando uma  
9 correlação forte entre a dosagem dessa citocina no soro periférico e na secreção  
10 endocervical. No grupo com HSIL, observa-se que a maioria das pacientes  
11 apresentou IL-12 elevada no soro periférico quando comparada com a presença da  
12 citocina na secreção endocervical, com uma correlação fraca. Já no grupo com  
13 câncer cervical o padrão de resposta modifica-se, uma vez que apresenta  
14 concentrações elevadas de IL-12 na secreção endocervical e no soro periférico.

15  
16 **Figura 10** – Correlação por grupos da dosagem de IL-12 na secreção endocervical e soro periférico  
17 nos grupos de pacientes com diferentes diagnósticos: (A) LSIL; (B) HSIL; (C) câncer cervical invasivo.  
18 **O grupo LSIL apresentou uma correlação moderada com valor  $r^2 = 0,5773$  (LSIL), enquanto os**  
19 **grupos HSIL e câncer cervical uma correlação fraca com valores de  $r^2 = 0,01447$  e  $r^2 = 0,007835$ ,**  
20 **respectivamente.** Houve significância estatística no grupo LSIL com  $p < 0,0001$ .



1 A figura 11 demonstra a dosagem de IFN- $\gamma$  na secreção endocervical e no soro  
 2 periférico de pacientes com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical invasivo.  
 3 Com relação à dosagem de IFN- $\gamma$  na secreção endocervical, observa-se que a  
 4 mesma permaneceu inalterada nos três grupos estudados. O soro periférico  
 5 apresentou-se com níveis de concentração mais baixo no grupo de pacientes com  
 6 diagnóstico de HSIL. Valores significativos foram encontrados no grupo de pacientes  
 7 com HSIL com  $p=0,0022$ .

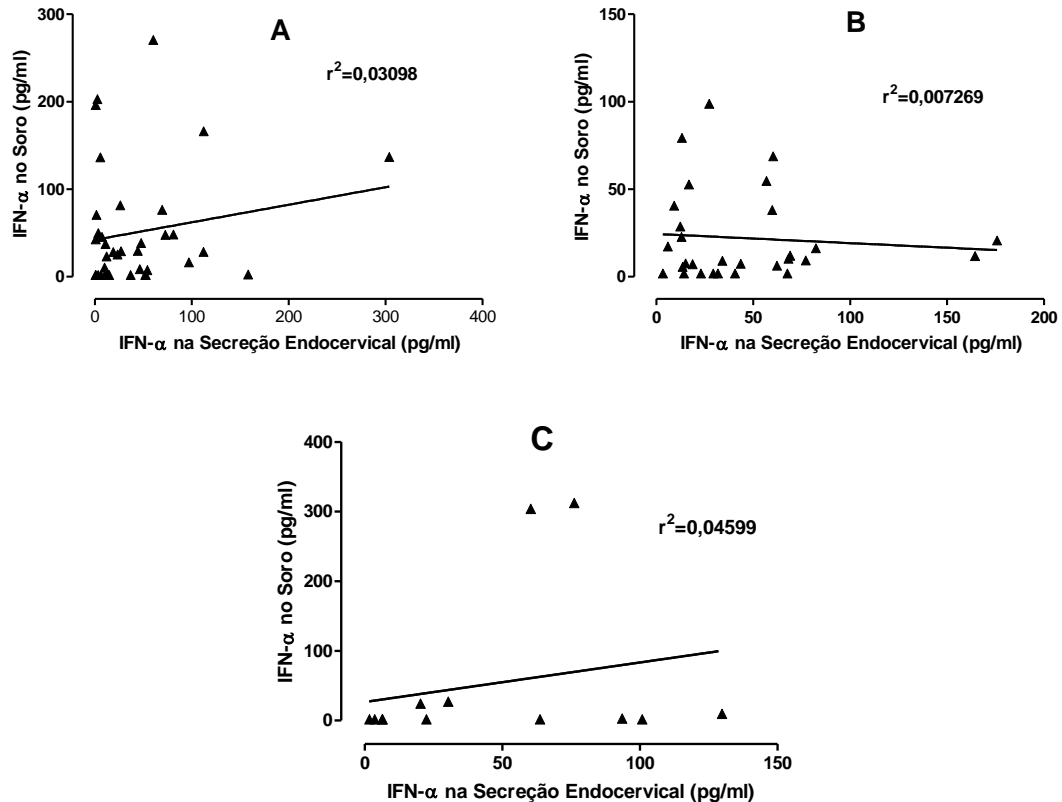
8  
 9 **Figura 11** – Representa a dosagem da citocina IFN- $\gamma$  no soro periférico e na secreção endocervical  
 10 de pacientes com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical. **O IFN- $\gamma$  apresentou a mesma**  
 11 **concentração na secreção endocervical nos três grupos estudados. No soro periférico, há uma**  
 12 **concentração mais baixa no grupo HSIL quando comparado aos grupos LSIL e câncer cervical**  
 13 **invasivo.** A dosagem de IFN- $\gamma$  no soro periférico e na secreção endocervical foi realizada por ELISA  
 14 e a análise estatística por Mann Whitney. Não houve valores significativos. LSIL (lesão intraepitelial  
 15 de baixo grau), HSIL (lesão intraepitelial de alto grau).



16  
 17 A figura 12 mostra a correlação existente entre a concentração de IFN- $\gamma$  na  
 18 secreção endocervical e no soro periférico em pacientes com LSIL, HSIL, câncer  
 19 cervical invasivo. Observa-se no grupo com LSIL (12A) e no grupo com HSIL (12B) o  
 20 mesmo padrão de correlação entre a concentração de IFN- $\gamma$  na secreção  
 21 endocervical e no soro periférico, com a maior parte das pacientes apresentando  
 22 dosagem de IFN- $\gamma$  na secreção endocervical quando relacionado com a dosagem no  
 23 soro periférico, mas algumas têm dosagem aumentada no soro periférico,  
 24 Correlação de Pearson fraca em ambos os grupos. Já o padrão de correlação nas  
 25 pacientes com câncer cervical invasivo mostra-se diferente, pois verifica-se que a

- 1 maior parte das pacientes possuem essa secreção aumentada na secreção
- 2 endocervical, no entanto, Correlação de Pearson fraca.
- 3

- 1 **Figura 12** – Correlação por grupos da dosagem de IFN- $\gamma$  na secreção endocervical e soro periférico  
 2 nos grupos de pacientes com diferentes diagnósticos: (A) LSIL; (B) HSIL; (C) câncer cervical invasivo.  
 3 **Observa-se uma expressão maior de IFN- $\gamma$  na secreção endocervical no grupo com câncer**  
 4 **cervical invasivo. Correlação de Pearson fraca nos três grupos estudados.**



5

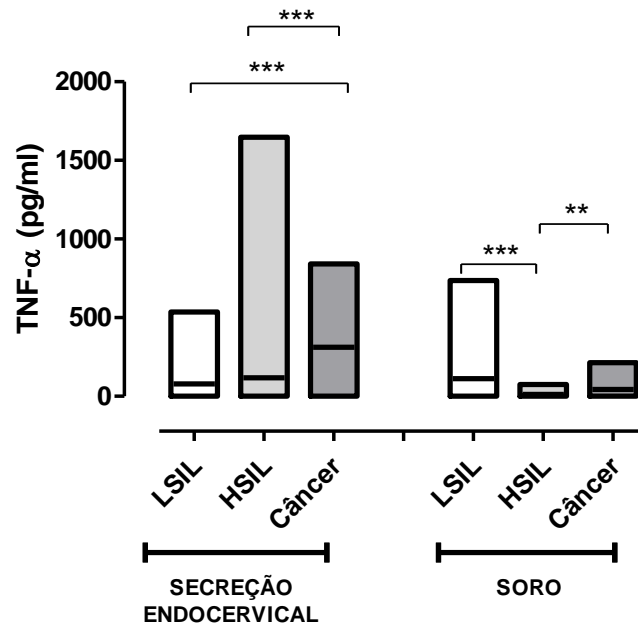
6

7

8 Conforme demonstra a figura 13, observa-se uma concentração elevada  
 9 (300pg/ml) de TNF- $\alpha$  na secreção endocervical no grupo de pacientes com câncer  
 10 cervical invasivo. Ao analisar o grupo das pacientes com diagnóstico de LSIL, nota-  
 11 se que o TNF- $\alpha$  está com uma concentração maior no soro periférico quando  
 12 comparado com a concentração na secreção endocervical. E no grupo com  
 13 diagnóstico de HSIL, observa-se um aumento maior da concentração da citocina na  
 14 secreção endocervical e uma concentração pequena no soro periférico. Os valores  
 15 da concentração de TNF- $\alpha$  foram significativos na análise da secreção endocervical,  
 16 com  $p=0,0003$ , quando comparado o grupo LSIL com o grupo com câncer cervical  
 17 invasivo, e um  $p=0,0005$  quando comparada a concentração de TNF- $\alpha$  no grupo  
 18 HSIL e câncer cervical uterino. Quando se observa o soro periférico, encontra-se  
 19 relevância significativa entre os grupos LSIL e HSIL com  $p<0,0001$  e entre os grupos  
 20 HSIL e câncer cervical invasivo, com  $p=0,0030$ .

21

1 **Figura 13** – Representa a dosagem da citocina TNF- $\alpha$  no soro periférico e na secreção endocervical  
 2 de pacientes com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical. **Observa-se uma concentração**  
 3 **elevada dessa citocina na secreção endocervical no grupo com câncer cervical uterino,**  
 4 **enquanto que no soro periférico observa-se o TNF- $\alpha$  alto no grupo LSIL.** A dosagem do TNF- $\alpha$   
 5 no soro periférico e na secreção endocervical foi realizada por ELISA e a análise estatística por Mann  
 6 Whitney. Na secreção endocervical, houve significância estatística entre os grupos LSIL e câncer  
 7 cervical invasivo com  $p=0,0003$  (\*\*\*) e entre o HSIL e o câncer cervical invasivo com  $p=0,0005$  (\*\*\*)  
 8 No soro periférico houve significância entre os grupos LSIL e HSIL, com  $p<0,0001$ (\*\*\*), e entre os  
 9 grupos HSIL e câncer cervical invasivo, com  $p=0,0030$  (\*\*). LSIL (lesão intraepitelial de baixo grau),  
 10 HSIL (lesão intraepitelial de alto grau).



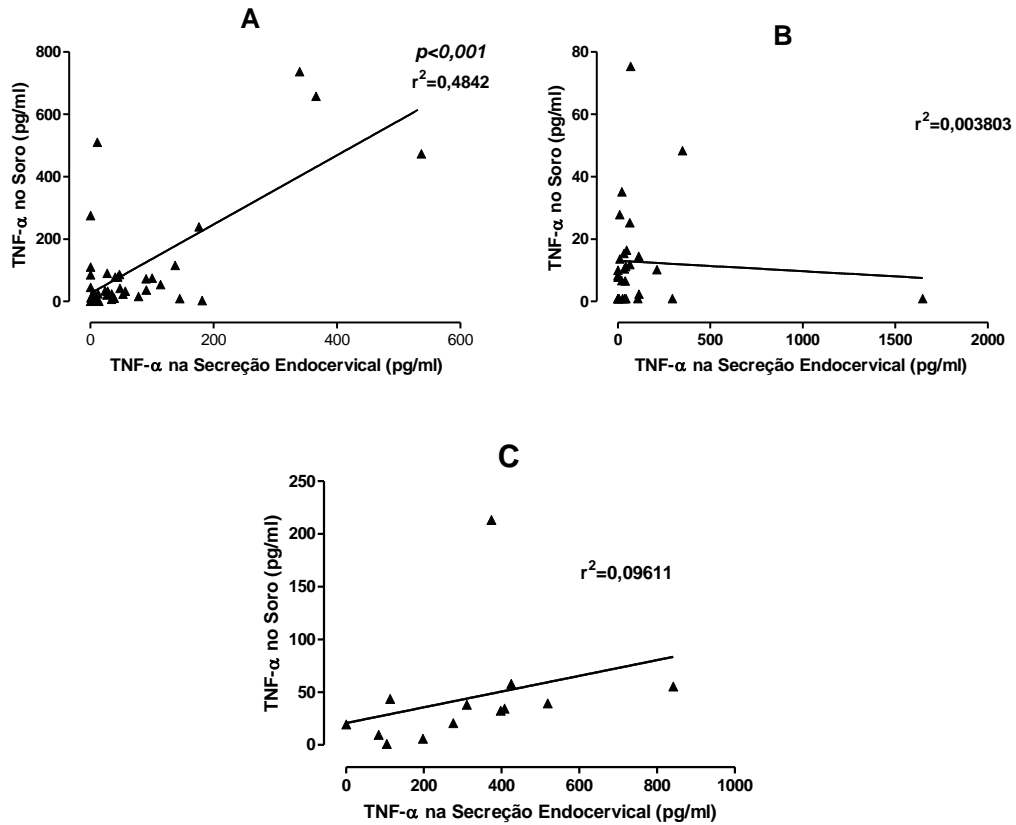
11

12

13 A figura 14 demonstra a correlação entre a dosagem de secreção TNF- $\alpha$  na  
 14 secreção endocervical e no soro periférico. Observa-se um padrão de correlação  
 15 semelhante no grupo de pacientes com LSIL e HSIL com dosagem baixa tanto de  
 16 secreção endocervical quanto de soro periférico. Já no grupo das pacientes com  
 17 câncer cervical invasivo, observa-se um padrão diferente com dosagem de TNF- $\alpha$   
 18 maior na secreção endocervical. Houve diferença significativa com  $p<0,0001$  no  
 19 grupo LSIL.

20

- 1 **Figura 14** – Correlação por grupos da dosagem de TNF- $\alpha$  na secreção endocervical e soro periférico  
 2 nos grupos de pacientes com diferentes diagnósticos: (A) LSIL; (B) HSIL; (C) câncer cervical invasivo.  
 3 **Nos três grupos estudados houve uma correlação baixa com valores  $r^2=0,4842$  (LSIL),**  
 4  **$r^2=0,003803$  (HSIL) e  $r^2=0,09611$  (câncer cervical), respectivamente.** Houve significância  
 5 estatística no grupo LSIL, com  $p<0,0001$ .



6

7

8



- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30

# *Discussão*

## 6 DISCUSSÃO

As lesões no colo uterino, bem como a progressão das mesmas para uma condição maligna, podem estar relacionadas com a infecção pelo HPV, sendo este considerado o principal precursor para uma série de alterações no colo uterino. (WRIGHT et al., 1994). Alguns estudos epidemiológicos relacionam o risco para o desenvolvimento dessas lesões com o número de parceiros sexuais, idade da primeira relação sexual, paridade, o uso de anticoncepcionais orais, entre outros fatores (ROSA et al., 2009; HIDESHEIM; WANG, 2002).

A idade mediana das mulheres no diagnóstico do câncer cervical foi de 51 anos (28 a 76 anos), o que corrobora com achados do trabalho de Renna Junior e Silva (2018) em um estudo com 65.843 mulheres com diagnóstico de câncer cervical avançado, quando verificaram que a mediana de idade no momento do diagnóstico foi de 52 anos (18 a 82 anos). Em outro estudo na cidade do Rio de Janeiro, Oliveira et al. (2006), avaliou 674 mulheres atendidas em serviços ginecológicos e observou no grupo com lesão de baixo grau uma mediana de idade de 31,5 anos e no grupo de pacientes com câncer cervical uma mediana de 46,9 anos. Esses dados são semelhantes aos resultados do nosso trabalho, uma vez que a mediana de idade para LSIL foi de 25 anos e para câncer cervical foi de 51 anos. De acordo com o Ministério da Saúde, com a implementação do Programa Nacional de Controle do Câncer de Colo do Útero, o rastreamento das alterações no colo uterino é dirigido para mulheres com idade entre 34 e 64 anos, no entanto no nosso trabalho mulheres entre 15 e 76 anos apresentaram alterações no colo uterino, seja elas LSIL, HSIL ou câncer de colo uterino (INCA, 2016).

A idade avançada no grupo com câncer cervical encontrada no momento do diagnóstico relaciona-se ao fato que o padrão de rastreio no Brasil é considerado oportunístico, ou seja, as mulheres têm realizado o exame citopatológico quando procuram os serviços de saúde em outras ocasiões e, como consequência, os exames são realizados fora do grupo etário recomendado, sendo o rastreamento do câncer de colo uterino um desafio a ser vencido pela equipe de saúde no intuito de se obter uma melhor cobertura populacional (INCA, 2016).

Segundo Gontijo et al. (2007), a idade da primeira relação sexual e o número de parceiros ao longo da vida são fatores de risco para a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de lesões no colo uterino. No nosso trabalho, observa-se uma

1 mediana de idade de 16 anos para o início da vida sexual ativa nos três grupos  
2 estudados. Quanto ao número de parceiros, a mediana foi de dois parceiros nos três  
3 grupos estudados o que contradiz a literatura, pois o número de parceiros está  
4 diretamente associado ao aparecimento de lesão.

5 Um estudo feito no Brasil em 2013, com 1.301.210 exames citopatológicos  
6 realizados em mulheres com idade inferior a 24 anos, evidenciou que 0,17% das  
7 mulheres apresentaram como resultado de HSIL e 0,0006% tiveram resultado de  
8 câncer, o que corrobora com nossos estudos, visto que a mediana de idade das  
9 mulheres com diagnóstico de HSIL foi 33 anos e com o câncer cervical com 51 anos  
10 (BRASIL, 2013).

11 As células tumorais têm a capacidade de alterar o seu microambiente na  
12 tentativa de suprimir uma resposta imunológica local para o favorecimento da sua  
13 própria proliferação. Essa alteração faz-se através da produção de algumas  
14 citocinas, entre elas o TGF- $\beta$  (SHEU et al., 2008; YOO et al., 2009). Essa citocina é  
15 responsável, principalmente, pela inibição da proliferação de outros tipos celulares  
16 (PINKAS, 2006; BIERIE; MOSES, 2006), favorecendo, então, o desenvolvimento da  
17 tumorigênese e a própria progressão tumoral (LEVY; HILL, 2006).

18 Alguns estudos identificaram que durante a progressão do tumor o TGF- $\beta$   
19 aumenta a sua expressão na secreção cervical (PINKAS, 2006), o que não se  
20 relaciona com os achados no nosso estudo, visto que essa citocina manteve uma  
21 concentração mais alta na secreção endocervical no grupo com LSIL quando  
22 comparado com os outros grupos estudados.

23 Por outro lado, estudos mostram que existe uma correlação entre os níveis de  
24 TGF- $\beta$  nas células cancerígenas no colo uterino (LEVY; HILL, 2006), o que está de  
25 acordo com os dados encontrados no nosso estudo, pois a concentração dessa  
26 citocina permaneceu mais elevada no grupo com câncer cervical quando comparado  
27 com o grupo HSIL. Guimarães et al. (2014), em um estudo com mulheres infectadas  
28 e não infectadas com HIV, encontrou uma concentração maior de TGF- $\beta$  em  
29 amostras de tecido cervical com lesão de alto grau quando comparadas com  
30 pacientes com lesão de baixo grau, o que está em desacordo com o nosso trabalho,  
31 visto que encontramos uma correlação inversa.

32 Meulmeester e Ten Dijke (2011), ao analisar a concentração de TGF- $\beta$  no  
33 soro periférico, observou aumento dessa citocina de acordo com a progressão da  
34 doença, ou seja, conforme aumenta o grau de malignidade aumentam os valores

1 dessa citocina, o que está em desacordo com os achados do nosso estudo, no qual  
2 observamos uma concentração maior de TGF- $\beta$  no soro periférico no grupo LSIL e a  
3 concentração manteve no grupo HSIL e câncer invasivo. Esse dado se relaciona  
4 com o estudo realizado por Wu et al. (2002) com amostras de soro periférico,  
5 quando verificaram que ocorre uma diminuição da produção de TGF- $\beta$  de acordo  
6 com a progressão da lesão.

7 Observando cortes histológicos do estroma de pacientes, Machado (2001)  
8 observou níveis maiores de TGF- $\beta$  na zona de transformação, região propensa ao  
9 desenvolvimento de lesão no colo uterino. Esse achado corrobora com o nosso  
10 trabalho, visto que ocorreu expressão dessa citocina na secreção endocervical nos  
11 três grupos estudados. Sabe-se que níveis elevados de TGF- $\beta$  podem causar a  
12 supressão na proliferação de células T e células natural Killer (NK), ocasionando  
13 alterações imunológicas. Podem, ainda, bloquear e inibir a maturação de células  
14 dendríticas e células TCD4<sup>+</sup> *naïves*, bem como as respostas a linfócitos T citotóxicos  
15 (YATES et al., 2007; TIEMESSEN et al.; 2003; WAHL et al., 2004; GILBERT et al.,  
16 1997).

17 Com relação à IL-4, uma citocina ligada ao perfil Th2, em um estudo de Wu e  
18 Kurman (1997) foi encontrada maior concentração dessa citocina no soro periférico  
19 em casos de HSIL e no câncer cervical, o que se relaciona com o nosso trabalho,  
20 visto que foram encontradas dosagens maiores de IL-4 no grupo com HSIL. No  
21 entanto, o grupo do câncer apresentou concentração mais baixa do que os demais  
22 grupos estudados.

23 Mudanças na concentração de IL-4 no soro periférico ocorrem  
24 progressivamente da HSIL para o câncer cervical, de acordo com Bais et al. (2007),  
25 o que se apresenta contraditório com os dados encontrados no nosso trabalho.  
26 Contrário aos nossos resultados, o estudo de Sharma et al. (2007) demonstrou que  
27 a IL-4 no soro periférico aumenta com a progressão da lesão.

28 Quando se analisa a concentração de IL-4 na secreção endocervical, os  
29 níveis dessa citocina apresentam-se elevados em lesões pré-malignas (LSIL e HSIL)  
30 e malignas do colo uterino (BAIS et al., 2005), o que corrobora com o nosso estudo  
31 em que encontramos que a IL-4 mostrou-se aumentada de acordo com a progressão  
32 da doença. Entretanto, analisando os grupos separadamente, verificamos que o  
33 grupo HSIL apresentou a maior concentração dessa citocina quando comparado  
34 com os demais grupos.

1 A IL-10, citocina de perfil Th2, apresentou o aumento progressivo da sua  
2 expressão de acordo com a progressão da doença, em amostras de biópsias de  
3 lesões de alto e baixo grau e o câncer invasivo (BERMÚDEZ-MORALES et al., 2008;  
4 SYRJÄNEN et al., 2009), o que não se verifica no nosso estudo em que a  
5 concentração de IL-10 na secreção endocervical nos grupos HSIL e LSIL manteve-  
6 se constante. No entanto, foi observada uma concentração mais elevada dessa  
7 citocina no grupo com câncer invasivo de colo uterino, correlacionando com os  
8 estudos de Mindiola et al. (2008) e Clerici, Shearer e Clerici (1997), que também  
9 demonstraram o aumento da expressão de IL-10 no câncer cervical invasivo. Esses  
10 autores sugerem, ainda, que esse aumento poderia estar associado com o  
11 mecanismo de escape de células cervicais, pois a IL-10 é considerada uma potente  
12 citocina imunossupressora, inibindo, assim, a ativação das células T.

13 Em um estudo de Stanczuk et al. (2001), com mulheres saudáveis e com  
14 câncer cervical, verificou-se que as mulheres com câncer cervical tiveram uma  
15 expressão de IL-10 aumentada no soro periférico. Sabe-se que a IL-10 favorece a  
16 diferenciação dos linfócitos para um perfil Th2, impede a apresentação de antígenos  
17 para linfócitos TCD8<sup>+</sup> através da supressão da expressão do CHP de classe I e II  
18 (BEISSERT et al., 1995), pode também regular a sobrevivência ou a morte de  
19 células imunológicas (SAITO et al., 1999). Por isso, essas características são  
20 consideradas alguns mecanismos que podem favorecer a replicação do vírus e,  
21 conseqüentemente, possibilitar a progressão da doença (STANCZUK et al., 2001).

22 Em um estudo de Tsukui et al. (1996), com 140 mulheres, em que foram  
23 comparadas as concentrações de IL-2 no soro periférico de mulheres com LSIL,  
24 HSIL, câncer cervical invasivo e de mulheres com citologia normal, verificou-se que  
25 essa citocina diminui com a gravidade da lesão, dado esse que contradiz com os  
26 achados do nosso trabalho, visto que a concentração de IL-2 se mostrou elevada no  
27 grupo LSIL, seguida de uma expressão maior no grupo com câncer cervical. Isso  
28 pode ser justificado através do estudo de Chopra et al. (1989) que, ao analisar  
29 citocinas no sangue periférico de pacientes em todos os estadiamentos do câncer  
30 cervical, encontrou um aumento de IL-2 no soro periférico de mulheres com  
31 estadiamento II-IV, dado semelhante ao estadiamento das mulheres do nosso  
32 estudo.

33 Sharma et al. (2007), em um estudo com soro periférico de 125 pacientes  
34 com o diagnóstico de lesão do colo uterino, com câncer cervical e com mulheres

1 saudáveis, encontrou que os níveis de IL-2 mostraram um declínio significativo em  
2 mulheres com HSIL, dado que corrobora com o nosso estudo, visto que a IL-2  
3 mostrou-se diminuída no grupo HSIL.

4 Mindiola et al. (2008), ao analisar biópsia de colo uterino de mulheres com  
5 lesões precursoras e câncer cervical, demonstrou que a IL-2 aumenta sua  
6 concentração com a progressão da doença, dado que se relaciona parcialmente  
7 com os nossos achados, visto que ocorreu um aumento da expressão quando se  
8 compara o grupo LSIL com o grupo HSIL e com o câncer cervical. No entanto, ao  
9 analisar o grupo com alto grau e o câncer não foi observado esse aumento, como  
10 sugere a literatura.

11 Valle-Mendiola et al. (2016) sugere que a alta concentração de IL-2 nas  
12 células no câncer cervical estaria ligada com o recrutamento de linfócitos T para o  
13 local da lesão, regulando, assim, a resposta imune.

14 Em um estudo com 235 mulheres com diferentes graus de lesão no colo  
15 uterino foi pesquisada, no soro periférico, a presença do receptor para IL-2,  
16 denominado sIL-2R, através do método de ELISA. Foi observado um aumento desse  
17 receptor de IL-2 com o aumento da gravidade da doença, o que sugere que o  
18 sistema imunológico de mulheres com lesão do colo uterino seja ativado de forma  
19 específica à medida que a gravidade da doença aumenta. Mulheres com HSIL e  
20 câncer cervical apresentam uma resposta mediada por células de perfil Th1 em  
21 comparação com mulheres normais ou com LSIL (HILDESHEIM et al., 1997), dados  
22 que estão de acordo com os dados do nosso trabalho, em que foram verificados  
23 níveis de expressão maiores no grupo com câncer de colo uterino quando  
24 comparados com os grupos LSIL e HSIL.

25 No trabalho de Ung et al. (1999), com 478 mulheres diagnosticadas com LSIL  
26 (n=191), HSIL (n= 130), câncer cervical (n=37) e mulheres saudáveis (n= 120), em  
27 que foi coletado soro periférico dessas pacientes e realizado ELISA para verificação  
28 da expressão dos receptores de IL-2, observou-se que o grupo LSIL, quando  
29 comparadas com o grupo controle, apresentou maior expressão do receptor de IL-2.  
30 Quando foram comparados os grupos com LSIL e HSIL, verificou-se uma expressão  
31 semelhante entre os dois grupos e, ao analisar o grupo câncer com o HSIL,  
32 verificou-se uma expressão maior no grupo câncer. Esses dados corroboram com os  
33 achados do nosso trabalho, pois a concentração de IL-2 no soro periférico encontrou

1 expressão maior no grupo com câncer cervical quando comparado com os demais  
2 grupos.

3 Tjong et al. (2001), ao avaliar os níveis de citocinas em lavados cérvico  
4 vaginais de mulheres com lesões precursoras e com o câncer cervical, verificaram  
5 que os níveis de IL-12 estavam significativamente elevados em pacientes com  
6 câncer cervical em relação às pacientes com as lesões precursoras, demonstrando  
7 alterações imunes locais no ambiente cervical, o que contradiz os nossos achados,  
8 pois verificamos que a expressão de IL-12 apresentou-se maior no grupo LSIL,  
9 seguido do grupo com câncer de colo uterino.

10 Em desacordo com o nosso estudo, Giannini et al. (1998), em seu estudo,  
11 demonstra uma menor expressão de IL-12 em biópsias de lesão de alto grau e de  
12 câncer de colo de útero.

13 Jacobs et al. (1998), em seu estudo, descreveu uma diminuição de IL-12 em  
14 hemoculturas de pacientes com HSIL quando comparadas com grupos controles, o  
15 que corrobora com nos nossos achados, pois a expressão de IL-12 manteve-se mais  
16 baixa no grupo HSIL em relação aos grupos LSIL e câncer de colo uterino.

17 O IFN- $\gamma$ , produzido por células TCD4<sup>+</sup> diferenciadas no perfil Th1, é  
18 considerado uma molécula chave para a ativação de células efectoras citotóxicas  
19 como macrófagos, células NK e linfócitos TCD8<sup>+</sup>, sendo uma importante citocina  
20 para a resposta imune contra infecções virais (SCOTT et al., 2001; STANLEY,  
21 2006).

22 Em seu estudo Sharma e colaboradores (2007) relataram que, em  
23 sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico, o nível de  
24 IFN- $\gamma$  esteve reduzido nos pacientes com câncer cervical, o que está em desacordo  
25 com os dados obtidos no nosso trabalho, pois a expressão dessa citocina mostrou-  
26 se elevada no grupo com câncer cervical.

27 Em consonância com os resultados obtidos no nosso trabalho, tem-se o  
28 estudo Tjong e colaboradores (2001), que avaliou os níveis de citocinas na  
29 secreção endocervical de mulheres com lesão precursora e no câncer cervical e  
30 encontraram que os níveis TNF- $\alpha$  estavam elevados no grupo com câncer cervical.  
31 Esse dado é semelhante ao encontrado no nosso estudo, pois verificamos uma  
32 maior expressão no grupo com câncer cervical.

33 Bais et al. (2005) não encontrou diferença significativa ao estudar as  
34 concentrações de TNF- $\alpha$  no soro periférico das pacientes, o que está em desacordo

1 com o nosso estudo, pois obtivemos diferenças estatísticas entre os grupos com  
2 LSIL e HSIL e entre os grupos HSIL e câncer cervical.

3 Diante dos dados apresentados em nosso estudo, conclui-se que mulheres  
4 com diagnóstico de LSIL apresentaram elevados os níveis de TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$   
5 no soro periférico, polarizando para um perfil Th1 com características antitumorais.  
6 Na análise da secreção endocervical, nota-se aumento de IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$ , de  
7 acordo com a progressão da lesão, não encontrando um padrão de citocinas  
8 específicas para cada tipo de diagnóstico, ou seja, na secreção endocervical  
9 observa-se tanto um padrão Th1 quanto Th2 e essa dicotomia pode induzir a  
10 persistência da infecção, promovendo, assim, a progressão das lesões cervicais  
11 (MOTA et al., 1999; AZAR et al., 2004; BAIS et al., 2005).

12



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

# *Conclusão*

## 1 **7 CONCLUSÃO**

2

3           Mulheres com diagnóstico de LSIL apresentaram elevados os níveis de TGF-  
4  $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no soro periférico, polarizando para um perfil Th1 com  
5 características antitumorais.

6           Observou-se aumento de IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$  na secreção endocervical de  
7 acordo com a progressão da doença.

8           Há presença de uma correlação fraca entre a produção de citocinas séricas e  
9 na secreção vaginal nos diferentes tipos de lesão.

10

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30

# *Referências*

## REFERÊNCIAS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 8<sup>o</sup> ed. Rio Janeiro: Elsevier, 2015.

AIDÉ, S. et al. Neoplasia Intraepitelial Cervical. **DST – J bras Doenças Sex Transm**. Rio de Janeiro: 21(4): 166-170, 2009.

ARAÚJO, S. R. **Citopatologia e Histologia Básicas do Colo Uterino para Ginecologistas**. Curitiba: VP Editora, 1999.

Azar, K. K. et al. Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. **Hum Pathol**. 35(11): 1376-84, 2004.

BAIS, A. G. et al. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. **J Clin Pathol**. 58(10): 1096-100, 2005.

BAIS, A.G. et al. Cytokine release in HR-HPV(+) women without and with cervical dysplasia (CIN II and III) or Carcinoma, compared with HR-HPV(-) controls. **Mediators Inflamm**. V. 2007, Article ID 24147, 8 pages, 2007.

BEISSERT, S. et al. IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells. **J Immunol**. 154(3):1280–6, 1995.

BERMÚDEZ-MORALES, V. H. et al. Correlation Between IL-10 Gene Expression and HPV Infection in Cervical Cancer: A Mechanism for Immune Response Escape. **Cancer Invest**. 26(10): 1037-43, 2008

BIERIE, B.; MOSES, H. L. TGF-beta and cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**. 17(1–2):29–40, 2006

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Controle dos cânceres do colo do útero e da mama**. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2013

BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev**. 16(1):1-17. 2003.

CHOPRA, R.K. et al. Soluble interleukin 2 receptors released from mitogen stimulated human peripheral blood lymphocytes bind interleukin 2 and inhibit IL2 dependent cell proliferation. **Immunol Invest**. 18(8):961-73. 1989.

CLERICI, M.; SHEARER, G. M., CLERICI E. Cytokine dysregulation in invasive cervical carcinoma and other human neoplasias: time to consider the TH1/TH2 paradigm. **J Natl Cancer Inst**. 90(4): 261–263. 1998.

- 1 CRUVINEL, W. M. et al. Sistema Imunitário – Parte I: Fundamentos da imunidade  
2 inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória.  
3 **Rev. Bras. Reumatol.** 50(4):434-61, 2010  
4
- 5 DAROLT, J.; FREITAS, T. P.; FREITAS, L.S. Diagnóstico cinésiofisiológico-funcional de  
6 pacientes oncológicos internados no hospital São José de Criciúma/SC. **Arquivos**  
7 **Catarinenses de Medicina**, Criciúma, v. 40, n. 2, p-18-24, 2011.  
8
- 9 DESRUISSEAU, S. et al. Divergent effect of TGF-beta1 on growth and proteolytic  
10 modulation of human prostatic-cancer cell lines. **Int J Cancer.** v.66, p.796-801, 1996.  
11
- 12 DICKINSON J. A. et al. Reduced cervical cancer incidence and mortality in Canada:  
13 national data from 1932 to 2006. **BMC Public Health.** 12(992):1-13, 2012.  
14
- 15 FARZANEH, F. et al. The IL-10 -1082G polymorphism is associated with clearance of  
16 HPV infection. **BJOG.** 113(8):961-4, 2006.  
17
- 18 GEE, K. et al. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune  
19 disorders. **Inflamm Allergy Drug Targets.** 8(1):40-52. 2009.  
20
- 21 GIANNINI, S. L. et al. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the  
22 uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. **Clin Exp**  
23 **Immunol.** 113: 183-189. 1998.  
24
- 25 GILBERT, K. M. et al. Transforming growth factor-beta 1 induces antigen-specific  
26 unresponsiveness in naive T cells. **Immunol Invest.** 26(4):459-72. 1997.  
27
- 28 GONTIJO, R. C. et al. Human papillomavirus (HPV) infections as risk factors for  
29 cytological and histological abnormalities in baseline PAP smear-negative women  
30 followed-up for 2 years in the LAMS study. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.**  
31 133(2):239-46. 2007.  
32
- 33 GUEMBAROVSKI, R. L.; CÓLUS, I. M. S. Câncer: uma doença genética. **Genética**  
34 **na escola.** v. 3, n. 1, p.4-7, 2008.  
35
- 36 GUIMARÃES, M. V. M. et al. Cytokine Expression in the Cervical Stroma of HIV-  
37 Positive and HIV-Negative Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Viral**  
38 **Immunol.** 27(7):350-5. 2014  
39
- 40 HILDESHEIM, A. et al. Immune Activation in Cervical Neoplasia: Cross-sectional  
41 association between plasma soluble interleukin 2 receptor levels and disease.  
42 **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 6(10):807-13, 1997.  
43
- 44 HILDESHEIM, A.; WANG, S.S. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a  
45 review. **Virus Res.** 89(2):229-40. 2002.  
46
- 47 INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Diretrizes brasileiras para o**  
48 **rastreamento do câncer do colo do útero.** Coordenação de Prevenção e  
49 Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. Rio de  
50 Janeiro: INCA, 2016. Disponível em:

1 <[http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/DDiretrizes\\_para\\_o\\_Rastreamento\\_do\\_cancer\\_do\\_colo\\_do\\_uterio\\_2016\\_corrigido.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/DDiretrizes_para_o_Rastreamento_do_cancer_do_colo_do_uterio_2016_corrigido.pdf)>. Acesso em: 02 mar. 2018.

2  
3  
4 INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2018: incidência de**  
5 **câncer no Brasil. Coordenação de Prevenção e Vigilância.** Rio de Janeiro: INCA,  
6 2017. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>.  
7 Acesso em: 02 mar 2018.

8  
9 INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da Saúde. Condutas do  
10 INCA/MS: câncer do colo do útero. **Revista Brasileira de Cancerologia.** 46(4): 351-  
11 54. 2000a.

12  
13 INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da Saúde. Condutas do  
14 INCA/MS: neoplasia intra-epitelial cervical - NIC. **Revista Brasileira de**  
15 **Cancerologia.** 46(4): 355-57. 2000b.

16  
17 JACOBS, N. et al. Inverse modulation of IL-10 and IL-12 in the blood of women with  
18 preneoplastic lesions of the uterine cervix. **Clin Exp Immunol.** 111(1):219-24. 1998.

19  
20 JANEWAY, C.A. et al. **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença.** 6ª  
21 ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.

22  
23 KIMURA, E.T.; MATSUO, S.E.; RICARTE-FILHO, J.C. TGF $\beta$ , Activina e Sinalização  
24 SMAD em Câncer de Tiróide. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 51/5. 2007.

25  
26 KOBAYASHI, A. et al. Recent developments in understanding the immune response  
27 to human papilloma virus infection and cervical neoplasia. **Oncol Nurs Forum.**  
28 27(4):643-51. 2000.

29  
30 KUMAR, V. et al. **Robbins - Patologia básica das doenças.** 8. ed. Rio de Janeiro:  
31 Elsevier, 2010.

32  
33 KYO, S. et al. Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16  
34 by inflammatory cytokines. **Virology.** 200:130-9. 1994.

35  
36 LEVY, L.; HILL, C.S. Alterations in components of the TGF- $\beta$  superfamily signaling  
37 pathways in human cancer. **Cytokine Growth Factor Rev.** 17(1-2):41-58. 2006.

38  
39 LOEB, L. A.; HARRIS, C. C. Advances in chemical carcinogenesis: a historical  
40 review and prospective. **Cancer Res.** 68(17):6863-72. 2008.

41  
42 LOWY, D.R. HPV vaccination to prevent cervical cancer and other HPV-associated  
43 disease: from basic science to effective interventions. **J Clin Invest.** 126(1):5-11,  
44 2016.

45  
46 LUZINA, I.G. et al. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of  
47 “alternatives”. **J Leukoc Biol.** 92(4):753-64, 2012.

48  
49 MACHADO, F. A. Avaliação dos infiltrados de células do sistema imunológico no  
50 estroma do colo uterino de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical grau II – III

- 1 após tratamento com interferon alfa-2b intralesional. 2011. Dissertação (Patologia).  
2 Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2011.
- 3
- 4 MAEHARA, Y.; KAKEJI, Y.; KABASHIMA, A.; *et al*: Role of transforming growth  
5 factor-beta 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma. **J Clin Oncol**.  
6 17(2):607-14. 1999.
- 7
- 8 MESQUITA JUNIOR, D. et al. Sistema Imunitário – parte II: Fundamentos da  
9 resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev. Bras. Reumatol.** vol.50,  
10 n.5, pp.552-580. 2010.
- 11
- 12 MEULMEESTER, E.; TEN DIJKE, P. The dynamic roles of TGF- $\beta$  in cancer. **J**  
13 **Pathol.** 223(2):205–218. 2011.
- 14
- 15 MINDIOLA, R. et al. Increased number of IL-2, IL-2 receptor and IL-10 positive cells  
16 in premalignant lesions of the cervix. **Invest Clin.** 49(4):533-45. 2008.
- 17
- 18 MOTA, F. et al. The antigen-presenting environment in normal and human  
19 papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. **Clin Exp Immunol.**  
20 116(1):33-40. 1999.
- 21
- 22 NICOL, A. F. et al. Immune factors involved in the cervical immune response in the  
23 HPV/HIV co-infection. **J Clin Pathol.** 61(1):84-88. 2008.
- 24
- 25 OLIVEIRA L.H. et al. Human papillomavirus status and cervical abnormalities in  
26 women from public and private health care in Rio de Janeiro state, Brazil. **Rev Inst**  
27 **Med Trop Sao Paulo.** 48(5):279-85. 2006.
- 28
- 29 ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Rev Med.**  
30 89(1):21-31. 2010.
- 31
- 32 PARSLOW, T. G. **Imunologia Médica.** 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Koogan Guanabara,  
33 2004.
- 34
- 35 PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**, 7th ed. Wolters Kluwer, 2013.
- 36
- 37 PAZ, F. G. et al. The relationship between the antitumor effector of the IL-12 gene  
38 therapy and the expression of Th1 cytokines in an HPV 16 positive murine tumor  
39 model. **Mediators Inflamm.** 2014: 510846. 2014.
- 40
- 41 PECORELLI, S.; ZIGLIANI, L.; ODICINO, F. Revised FIGO staging for carcinoma of  
42 the cervix. **Int J Gynaecol Obstet.** 105(2):107-8. 2009.
- 43
- 44 PEINADO, H.; QUINTANILLA, M.; CANO, A. Transforming growth factor beta-1  
45 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial  
46 mesenchymal transitions. **J Biol Chem.** 278(23):21113-23. 2003.
- 47
- 48 PINKAS, J.; TEICHER, B. A. TGF-beta in cancer and as a therapeutic target.  
49 **Biochem Pharmacol.** 28;72(5):523-9. 2006.
- 50

- 1 PINTO, F. N. et al. Mutação do gene p53 induzindo predisposi o hereditária ao  
2 câncer: relato de um caso da síndrome de Li-Fraumeni. **Rev Med.** 81(1/4):42-6,  
3 2002.
- 4
- 5 RENNA JUNIOR, N.L.; SILVA, G.A. Tendências temporais e fatores associados ao  
6 diagnóstico em estágio avanado de câncer do colo uterino: análise dos dados dos  
7 registros hospitalares de câncer no Brasil, 2000-2012. **Epidemiol. Serv. Saude,**  
8 Brasília, 27(2):e2017285, 2018.
- 9
- 10 RIVOIRE, W. A. et al. Bases biomoleculares da oncog nese cervical **Revista**  
11 **Brasileira de Cancerologia**, 47(2): 179-84. 2001.
- 12
- 13 ROSA, M. I. et al. Papilomav rus humano e neoplasia cervical. **Cad. Saúde Pública.**  
14 25(5): 953-964. 2009
- 15
- 16 SAITO, I. Fas ligand-mediated exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in mice  
17 transgenic for IL-10. **J Immunol.** 162(5):2488-94. 1999.
- 18
- 19 SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat**  
20 **Rev Immunol.** 10(3):170-81, 2010.
- 21
- 22 SCOTT, M.; NAKAGAWA, M.; MOSCICKI, A. B. Cell-mediated immune response to  
23 human papillomavirus infection. **Clin Diagn Lab Immunol.** 8(2):209-20. 2001.
- 24
- 25 SELLORS J.W. **Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical:**  
26 **manual para principiantes.** Washington, D.C. OPAS, 2004.
- 27
- 28 SHARMA, A. et al. Cytokine profile in Indian women with cervical intraepithelial  
29 neoplasia and cancer cervix. **Int J Gynecol Cancer.** 17(4):879-85. 2007.
- 30
- 31 SHEU, B. C. et al. Cytokine regulation networks in the cancer microenvironment.  
32 **Front Biosci.** 13:6255-68. 2008.
- 33
- 34 SHEU, B. C. et al. Predominant Th2/Tc2 Polarity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in  
35 Human Cervical Cancer. **J Immunol.** 167(5):2972-2978, 2001.
- 36
- 37 SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinog nese hormonal e  
38 neoplasias hormonio-dependentes. **Ciência Rural.** v.34, n.2, p.625-633. 2004.
- 39
- 40 SON, K.S. et al. Hypomethylation of the interleukin-10 gene in breast cancer tissues.  
41 **Journal homepage: www.elsevier.com/breast.** 484-388, 2010.
- 42
- 43 SONG, S. H. et al. Interferon-gamma (IFN-gamma): a possible prognostic marker for  
44 clearance of high-risk human papillomavirus (HPV). **Gynecol Oncol.** 108(3):543-8.  
45 2008.
- 46
- 47 SOUFLA, G. et al. VEGF, FGF2, TGFB1 and TGFBR1 mRNA expression levels  
48 correlate with the malignant transformation of the uterine cervix. **Cancer Lett.**  
49 221(1):105-18. 2005.
- 50



- 1 STANCZUK, G.A. et al. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated  
2 with gene polymorphism coding for increased IL-10 production. **Int. J. Cancer.**  
3 94(6):792-4. 2001.
- 4
- 5 STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine.** 24 Suppl  
6 1:S16-22. 2006.
- 7
- 8 SYRJÄNEN, S. et al. Immunosuppressive cytokine Interleukin-10 (IL-10) is up-  
9 regulated in high-grade CIN but not associated with high-risk human papillomavirus  
10 (HPV) at baseline, outcomes of HR-HPV infections or incident CIN in the LAMS  
11 cohort. **Virchows Arch.** 455(6):505-15. 2009.
- 12
- 13 TARTOUR, E. et al. Analysis of interleukin-6 gene expression in cervical neoplasia  
14 using a quantitative polymerase chain reaction assay: evidence for enhanced  
15 interleukin 6 gene expression in invasive carcinoma. **Cancer Res.** 54(23):6243-8.  
16 1994.
- 17
- 18 TIEMESSEN, M. M. et al. Transforming growth factor-beta inhibits human antigen-  
19 specific CD4+ T cell proliferation without modulating the cytokine response. **Int**  
20 **Immunol.** 15(12):1495-504. 2003.
- 21
- 22 TJIONG, M. Y. et al. Cytokines in cervicovaginal washing fluid from patients with  
23 cervical neoplasia. **Cytokine.** 14(6):357-60. 2001.
- 24
- 25 TORREZINI, T.; ATHANÁZIO, D. A. Imunovigilância e imunoedição de neoplasias:  
26 implicações clínicas e potencial terapêutico. **Revista Brasileira de Cancerologia.**  
27 54(1): 63-77. 2008.
- 28
- 29 TSUKUI, T. et al. Interleukin 2 production in vitro by peripheral lymphocytes in  
30 response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical  
31 pathology. **Cancer Res.** 56(17):3967-74. 1996.
- 32
- 33 UNG, A. et al. Soluble interleukin 2 receptor levels and cervical neoplasia: results  
34 from a population-based case-control study in Costa Rica. **Cancer Epidemiol**  
35 **Biomarkers Prev.** 8(3):249-53. 1999.
- 36
- 37 VALLE-MENDIOLA, A. et al. Pleiotropic effects of IL-12 on cancer: Its role in cervical  
38 cancer. **Mediators Inflamm.** 2016:2849523. 2016.
- 39
- 40 VARELLA, P. P. V.; FORTES, W. C. N. Citocinas: revisão. **Rev. bras. alerg.**  
41 **Imunopatol.** 24(4):146-154. 2001.
- 42
- 43 WAHL, S. M. et al. TGF-beta: the perpetrator of immune suppression by regulatory T  
44 cells and suicidal T cells. **J Leukoc Biol.** 76(1):15-24. 2004.
- 45
- 46 WEINSTEIN, I. B., JOE, A. K. Mechanisms of disease: Oncogene addiction – a  
47 rationale for molecular targeting in cancer therapy. **Nat Clin Pract Oncol.** 3(8):448-  
48 57. 2006.
- 49

- 1 WRIGTH, T. C. Jr. Cervical intraepithelial neoplasia in women infected with human  
2 immunodeficiency virus: prevalence, risk factors and validity of Papanicolaou smears.  
3 New York Cervical Disease Study. **Obstet Gynecol.** 84(4):591-7. 1994.  
4
- 5 WU, H. S. et al. The concentration of serum transforming growth factor beta-1 (TGF-  
6 beta1) is decreased in cervical carcinoma patients. **Cancer Invest.** 20(1):55–59.  
7 2002  
8
- 9 WU, T. C.; KURMAN, R. J. Analysis of cytokine profiles in patients with human  
10 papillomavirus-associated neoplasms. **J Natl Cancer Inst.** 89(3):185-7. 1997.  
11
- 12 YATES, J. et al. The maintenance of human CD4+ CD25+ regulatory T cell function:  
13 IL-2, IL-4, IL-7 and IL-15 preserve optimal suppressive potency in vitro. **Int.**  
14 **Immunol.** 19(6):785-99. 2007.  
15
- 16 YOO, S. Y.; LEE, S. Y.; YOO, N. C. Cytokine expression and cancer detection. **Med**  
17 **Sci Monit.** 15(3):49–56. 2009.  
18
- 19 ZOOSMA, M. et al. Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for  
20 (pre)neoplastic cervical disease. **Int J Gynecol Cancer.** 15 Suppl 3:282-90. 2005.  
21  
22

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30

*Anexo*

1 ANEXO A – Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM (683-2006/CEP)  
2




Mem 09/08/IPON/UFTM  
Uberaba, 10 de Junho de 2008

Ao Sr. João Batista Ribeiro  
Coordenador do CEP-UFTM

Prezado Coordenador,

Venho por meio deste solicitar que no Parecer Consubstanciado (Parecer 683 de 10/03/2006), que trata de Imunoterapia com Células Dendríticas, sejam incluídos grupos de pacientes com neoplasias em outros órgãos, além do colo uterino. A presente solicitação justifica-se pelo fato de que a terapia citada pode ser aplicada no tratamento de neoplasia em outros órgãos por se tratar da mesma metodologia e dos mesmos reagentes descritos anteriormente, constituindo-se em um avanço para pacientes cujas terapias convencionais não são possíveis de serem realizadas, ou que não apresentaram resultados clínicos.

Atenciosamente,

  
 Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta  
 Prof. Titular – Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia  
 Instituto de Pesquisa em Oncologia – IPON  
 Coordenador do Projeto

  
 João Batista Ribeiro  
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM