

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - UFTM

**PARTICIPAÇÃO DE MEDIADORES
CIRCULANTES NA REDUÇÃO DA MIGRAÇÃO
DE NEUTRÓFILOS EM PACIENTES COM
NEOPLASIA DE COLO UTERINO.**

DOUGLAS CÔBO MICHELI

**UBERABA - MG
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DOUGLAS CÔBO MICHELI

**PARTICIPAÇÃO DE MEDIADORES
CIRCULANTES NA REDUÇÃO DA MIGRAÇÃO
DE NEUTRÓFILOS EM PACIENTES COM
NEOPLASIA DE COLO UTERINO.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, área de concentração “Patologia Clínica”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa Dra Beatriz Martins Tavares Murta
Co-Orientador: Prof. Dr Eddie Fernando Cândido Murta

**UBERABA - MG
Dezembro, 2009**

Catálogo na fonte: Biblioteca da UFTM

M57p Micheli, Douglas Cobo.

Participação de mediadores circulantes na redução da migração de neutrófilos em pacientes com neoplasia de colo uterino / Douglas Cobo Micheli. - 2009.

129 f.: tab. ; graf. ; fig.

Dissertação de Mestrado em Ciências, área Patologia Clínica - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2009.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Beatriz Martins Tavares Murta.

1. NEOPLASIA DE COLO UTERÍNO. 2. ESTADIAMENTO TUMORAL. 3. NEUTRÓFILO. 4. MIGRAÇÃO CELULAR. 5. CITOCINAS. 6. ÓXIDO NÍTRICO. I. Título. II. Tavares-Murta, Beatriz Martins.

CDU 618.14-006

APOIO FINANCEIRO

- Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)
- Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq)

LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

- Laboratório da Disciplina de Farmacologia do Departamento de Ciências Biológicas da UFTM
- Laboratório do Instituto de Pesquisa em Oncologia / IPON da UFTM
- Ambulatório de Oncologia Ginecológica e Mastologia da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Escola da UFTM

DESENVOLVIMENTO TÉCNICO

- **Beatriz Cibele Resende Gerolin**
- **Januário Barbosa dos Santos Júnior**

Douglas Côbo Micheli

**Participação de mediadores circulantes na redução na migração de neutrófilos em
pacientes com neoplasia de colo uterino.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Patologia Clínica.

Uberaba, 04 de Dezembro de 2009

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. BEATRIZ MARTINS TAVARES MURTA
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM/Uberaba

Prof^a. Dra. KARINA FERRAZZOLI DEVIENNE VICENTINE
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM/Uberaba

Prof^a. Dra. ANDRÉIA MACHADO LEOPOLDINO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP/ Ribeirão Preto

Dedico Este Trabalho Especialmente:

Aos meus pais **José Micheli e Sônia**, pelo exemplo de vida e dedicação.

A meus irmãos **Hudson e Núbia**, sinto-me orgulhoso por tê-los como irmãos.

A minha linda esposa **Elma** pelo amor, incentivo, companheirismo e por acreditar em mim.

Ao nosso filho **Arthur**, um presente de Deus.....

Agradecimentos

Eu Acredito que “**Agradecimentos**” são sempre difíceis, ou por que as palavras não conseguem expressar os verdadeiros sentimentos ou a memória pode falhar em alguns nomes. Nossa vida é composta de desafios e ninguém consegue vencer nada sozinho, estou finalizando mais uma etapa em minha vida, só consegui porque tenho amigos e uma família maravilhosa ao meu lado....

Agradeço a **Deus** por me dar à vida e o discernimento para percorrer um caminho longo, porém compensador...

Agradeço em especial à **Prof^a. Dra Beatriz** pela orientação, amizade, paciência e respeito. Uma pessoa com o dom de ensinar, muito obrigado.

Agradeço ao **Prof. Dr Eddie Murta** pela co-orientação, sugestões e amizade.

Agradeço ao **Prof. Dr Valter Marques** pela colaboração e amizade.

Agradeço também minha amiga **Beatriz Gerolin** e ao meu “amigo irmão” **Januário Jr.** pela demonstração de amizade sincera, incentivo e colaboração....

Agradeço também a **Cristiana Bernadelli, Maria Angélica e ao Dr. Paulo César** por me ajudarem em todos os momentos desta jornada com presteza e amizade.

Agradeço aos Professores **Anderson Assunção, Paulo Maluf e Virgínia Crema** pelas sugestões feitas durante a qualificação.

Agradeço aos **Funcionários da UFTM** pelo carinho, em especial pelo **Campus I** a todos os amigos que sempre me incentivaram.

Às **Mulheres**, pacientes e voluntárias, pela participação e especialmente, por acreditarem na ciência e assim contribuir para o desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigado!!!

"Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe provando o contrário."
(Albert Enistein)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Neoplasia de Colo Uterino – Epidemiologia e Fatores de Risco	21
1.2. Resposta Inflamatória	27
1.3. Inflamação e Câncer	31
1.4. Alterações de Funções de Leucócitos no Câncer	32
2. HIPÓTESE	35
3. OBJETIVOS	37
4. MÉTODOLOGIA	39
4.1. Pacientes e Controles	40
4.2. Coleta de Sangue	41
4.3. Avaliação da Função Quimiotática de Neutrófilos Circulantes	42
4.3.1. <i>Obtenção e Preparo dos Neutrófilos Circulantes</i>	42
4.3.2. <i>Tratamento de Neutrófilos Normais com Soro de Pacientes</i>	43
4.3.3. <i>Ensaio de Quimiotaxia</i>	44
4.4. Cultura de leucócitos para avaliação da produção de mediadores inflamatórios	49
4.5. Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas	49
4.6. Ensaio colorimétrico para quantificação de metabólitos de óxido nítrico.....	51
4.7. Análise Estatística	52

4.8.	Preparo de Meios de Cultura, Soluções, Reagentes e Drogas	53
4.8.1.	<i>Meios de Cultura e Soluções</i>	53
4.8.2.	<i>Soluções e tampões utilizados durante a realização do ELISA</i>	54
4.8.3.	<i>Estímulos Quimioatraentes</i>	56
4.8.4.	Tampões e reagentes para dosagem de NO - Reação de Griess	56
4.8.5.	<i>Corantes e Reagentes</i>	58
5.	RESULTADOS	59
5.1.	População de estudo	60
5.2.	Avaliação da função quimiotática de neutrófilos normais incubadas com soro de pacientes e controles	62
5.3.	Concentração sérica de citocinas em controles e pacientes com neoplasia de colo uterino em diferentes estadiamentos.....	66
5.4.	Concentração sérica de metabolitos de NO em controles e pacientes com neoplasia de colo uterino em diferentes estadiamentos	66
5.5.	Produção de citocinas nos sobrenadantes de neutrófilos de controles e pacientes com neoplasia de colo uterino	69
5.6.	Produção de oxido nítrico nos sobrenadantes de leucócitos de controles e pacientes com neoplasia de colo uterino	71
5.7.	Avaliação da função quimiotática de neutrófilos normais incubados com soro de pacientes após tratamento cirúrgico	73
5.8.	Concentração sérica de citocinas em controles e pacientes com neoplasia de colo uterino antes e após tratamento cirúrgico	75
5.9.	Concentração sérica de metabólicos de óxido nítrico em controles e pacientes com neoplasia de colo uterino antes e após tratamento cirúrgico	75

5.10. Produção de citocinas e nitrito nos sobrenadantes de leucócitos de pacientes com neoplasia de colo uterino, antes e após tratamento cirúrgico	78
6. DISCUSSÃO	81
7. CONCLUSÃO	92
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Tipos de câncer mais incidentes para 2008.....	22
Figura 2. Representação espacial das taxas brutas de incidência da neoplasia de colo uterino por 100.000 mulheres, estimadas para o ano 2008.....	22
Figura 3. Sequência de eventos envolvidos no processo de transmigração celular.....	28
Figura 4. Separação de leucócitos a partir do sangue total contendo anticoagulante.....	43
Figura 5. Microcâmara de quimiotaxia.....	45
Figura 6. Curva dose-efeito do número de neutrófilos emigrados	46
Figura 7. Quimiotaxia de neutrófilos normais após incubação com diferentes concentrações (0,5%; 5% e 50%) de soro obtido de pacientes com neoplasia pré-invasiva (grupo NIC) Micro-invasiva (grupo Micro-Invasivo) e invasivo (grupo-Invasivo)	64
Figura 8. Número de neutrófilos normais emigrados após incubação com soro (50%) obtido de voluntárias sadias e de pacientes com neoplasia de colo uterino, em resposta ao RPMI e aos estímulos quimiotáticos (10^{-7} M) fMLP, LTB ₄ e IL-8.....	65
Figura 9. Concentrações de TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 no soro de controles e pacientes com neoplasia de colo uterino	67
Figura 10. Concentrações de metabólitos de NO (μ M de NO ₂ +NO ₃) no soro de controles e pacientes com neoplasia de colo uterino em diferentes estadiamentos	68
Figura 11. Concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 nos sobrenadantes de neutrófilos estimulados por LPS (1 μ g/ml) após 24 h, obtidos de controles e pacientes com neoplasia de colo uterino	70
Figura 12. Concentrações de nitrito (μ M de NO ₂) nos sobrenadantes de neutrófilos e células mononucleares obtidos de controles e pacientes com neoplasia de colo uterino em diferentes estadiamentos	72
Figura 13. Número de neutrófilos normais emigrados após incubação com soro (0,5%; 5% e 50%) obtido de pacientes com neoplasia pré-invasiva do colo uterino (NIC) antes do tratamento e após tratamento cirúrgico	74
Figura 14. Concentrações de TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 no soro de pacientes com neoplasia de colo uterino antes e após tratamento cirúrgico	76

Figura 15. Concentrações de metabólitos de NO (μM de NO_2+NO_3) no soro de pacientes com neoplasia de colo uterino antes e após tratamento cirúrgico	77
Figura 16. Concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 nos sobrenadantes de neutrófilos estimulados por LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) após 24 h, obtidos de pacientes com neoplasia de colo uterino antes e após (30 a 60 dias) tratamento cirúrgico	79
Figura 17. Concentrações de nitrito (μM de NO_2) nos sobrenadantes de neutrófilos e células mononucleares obtidos de pacientes com neoplasia de colo uterino antes e após (30 a 60 dias) tratamento cirúrgico	80
Tabela 1. Identificação das pacientes quanto à idade, estadiamento da doença e conduta terapêutica inicial.....	61
Prancha 1. Neutrófilos purificados com Meio Histopaque 1119 coloração Rosenfeld 1000x. (Foto 1); quimiotaxia de neutrófilos coloração Rosenfeld 100x (Foto 2) e quimiotaxia de neutrófilos coloração Rosenfeld 1000x (foto 3).....	47

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AGP – Alfa-1 glicoproteína ácida

AMPc – monofostato de adenosina cíclico

APC – célula apresentadora de antígenos

BSA – soro albumina bovina

°C – grau Celsius

CA – carcinoma

CCL – quimiocinas ligante da família CC

CO₂ – dióxido de carbono

DMSO – dimetil sulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

DP – desvio padrão

FIGO – Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

fMLP – formil-metil-leucil-fenilalanina

g – grama

HE – Hospital Escola

HPV – papiloma vírus humano

IF – índice fagocítico

IFN – interferon

IL – interleucina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

l – litro

LT – leucotrieno

μl – microlitro

µm – micrômetro

M – molar

MCP – proteína quimiotática para monócitos

M-CSF – fator estimulador de colônia de monócitos

mg – miligrama

MHC – complexo de histocompatibilidade principal

min – minuto

MIP – proteína inflamatória de macrófagos

ml – mililitro

n – número da amostra

N – normal

NIC – neoplasia intraepitelial cervical

NK – natural killer

NO – óxido nítrico

NOS – sintase óxido nítrico

P.A. – para análise

PBS – solução salina tamponada com fosfato

pH – potencial hidrogeniônico

q.s.p. – quantidade suficiente para

RNA – ácido ribonucléico

TGF – fator de crescimento e transformação

TNF – fator de necrose tumoral

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

UI – Unidade internacional

VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular

RESUMO

O câncer de colo uterino é o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres no mundo. A migração celular é um evento chave na resposta inflamatória de qualquer etiologia, incluindo o câncer. Já demonstramos alterações no número e funções de neutrófilos circulantes em pacientes com câncer invasivo de colo uterino, comparado ao grupo controle e grupo em estadiamentos iniciais. Neste último grupo, houve aumento na migração dos neutrófilos após cirurgia, sugerindo a produção de mediadores pelas células tumorais, capazes de inibir a migração das células circulantes. Para testar esta hipótese, foi avaliada a migração de neutrófilos normais após incubação com soro de pacientes com neoplasia de colo uterino em diferentes estadiamentos: carcinoma *in situ* ou neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (Grupo NIC, n=5), carcinoma microinvasivo (n=5) e carcinoma invasivo (n=5). Neutrófilos obtidos de voluntárias sadias (n=15) foram tratados com diferentes concentrações (0,5%, 5% e 50%) de soro obtido de pacientes ou soro heterólogo normal (50%). A migração das células foi avaliada em microcâmara de quimiotaxia em resposta aos estímulos fMLP, LTB₄ e IL-8. Em todos os grupos de pacientes foi observada redução, concentração-dependente, da migração dos neutrófilos frente aos quimioatraentes, atingindo a máxima inibição após incubação com soro a 50%, comparado à menor concentração. Mais importante, a incubação de neutrófilos normais com soro heterólogo normal (n=7) não alterou a capacidade de migração dessas células, embora a mesma concentração de soro obtido dos grupos de pacientes com neoplasia de colo uterino tenha promovido completa inibição da migração de neutrófilos do grupo controle (p<0,05). Mediadores circulantes como citocinas e óxido nítrico (NO) podem reduzir a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório. Assim as concentrações séricas de TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 e de metabólitos de NO foram quantificadas no soro obtido do grupo controle (n=29) e de pacientes (n=45) com neoplasia de colo uterino, e em sobrenadantes da cultura de neutrófilos (24h) e células mononucleares (48h), previamente estimulados com LPS (1 μ g/ml). Houve aumento de IL-6 (p<0,01) e IL-8 (p<0,05) e de TNF- α (p=0,086) no grupo total de pacientes (n=45) comparado ao grupo controle (n=13), sendo o aumento de IL-6 (p<0,05) e IL-8 (p<0,05) também detectado no grupo invasivo (n=22). No sobrenadante da cultura de neutrófilos foi observada maior produção de IL-10 (p<0,05) e TNF- α (p=0,057) no grupo de pacientes (n=11) comparado ao grupo controle (n=7), e também no grupo Invasivo (n=5; p<0,05). Não foi observado aumento estatisticamente significativo de metabólitos de NO no soro do grupo total de pacientes (p=26) comparado ao controle (n=29). Porém, a análise por estadiamentos demonstrou aumento significativo para o grupo microinvasivo (n=4; p<0,05). Nos sobrenadantes da cultura de leucócitos houve produção diferencial de NO, isto é, em neutrófilos foi observada redução nas concentrações de nitrito no grupo total de pacientes (n=11; p<0,01) e nos estadiamentos NIC e Invasivo (p<0,05), enquanto que na cultura de células mononucleares houve aumento das concentrações de NO tanto no grupo total de pacientes (n=11; p<0,01) quanto nos estadiamentos NIC e Invasivo (p<0,05). Para reforçar esses resultados, a função quimiotática de neutrófilos normais e produção de mediadores foram avaliadas também após tratamento cirúrgico. A incubação de neutrófilos normais (n=5) com soro de pacientes do grupo NIC, após tratamento cirúrgico, promoveu significativa migração de neutrófilos ao fMLP, LTB₄ e IL-8 comparado à migração aleatória,

demonstrando restauração da capacidade quimiotática. As concentrações séricas de TNF- α ($p=0,052$), IL-6, IL-8 e IL-10 ($p<0,05$) apresentaram-se reduzidas no grupo após tratamento cirúrgico comparado ao pré-tratamento ($n=19$), com diferenças também observadas no grupo NIC para IL-6 ($p<0,05$) e IL-8 ($p=0,076$), bem como no Invasivo para IL-10 ($p=0,073$). As concentrações de NO também foram reduzidas no grupo total ($n=26$; $p<0,05$) e grupo NIC ($n=13$; $p<0,05$) no pós-tratamento comparado aos seus respectivos grupos pré-tratamento. Não foram detectadas alterações na produção de citocinas e NO nos sobrenadante da cultura de neutrófilos e células mononucleares pós-tratamento comparado aos grupos pré-tratamento. Em conjunto, os resultados demonstram que pacientes com neoplasia de colo uterino, mesmo em estágio pré-invasivo, produzem mediadores circulantes como IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e NO, capazes de inibir a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório. Esses mediadores podem ser produzidos por leucócitos circulantes, e possivelmente pelas células tumorais, visto que a retirada do tumor reverte os efeitos observados. Ainda os dados indicam um comprometimento da resposta inflamatória em fases iniciais da doença.

Palavras-chave: neoplasia de colo uterino; estadiamento tumoral; neutrófilo; migração celular; citocinas; óxido nítrico

ABSTRACT

Uterine cervical cancer is the second most common cancer in women worldwide. Cell migration is a key event in the inflammatory response of any origin, including cancer. We have previously demonstrated alterations in the number and function of circulating neutrophils in patients with invasive cervical cancer, compared to control group and with patients at initial stages of disease. In the latter group, there was an increase in migration of neutrophils after surgery, suggesting that tumor cells could be producing inhibitory soluble mediators on the migration of circulating cells. To test this hypothesis, it was evaluated the migration of control neutrophils after incubation with serum of cervical neoplasia patients at different stages: carcinoma *in situ* or high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN group, n=5), microinvasive (n=5) and invasive carcinoma (n=5). Neutrophils obtained from healthy volunteers (n=15) were treated with different concentrations (0.5%, 5% and 50%) of serum obtained from patient or heterologous normal serum (50%). The migration of cells was assessed in a microchemotaxis chamber assay in response to the stimuli fMLP, LTB₄ and IL-8. In all patient groups it was observed, in a dose-dependent way, reduced neutrophil migration to the chemoattractants, reaching maximum inhibition after incubation with 50% serum compared to the lowest concentration. More relevant, incubation of control neutrophils with normal heterologous serum (n=7) did not alter the migratory capacity of these cells, although the same concentration of serum obtained from all patient groups completely inhibited the migration of control neutrophils (p<0.05). Since circulating mediators such as cytokines and nitric oxide (NO) may reduce neutrophil migration to the inflammatory site, the serum concentrations of TNF- α , IL-6, IL-8 and IL-10 and NO metabolites were quantified in serum samples obtained from control (n=29) and patients with cervical neoplasia (n=45), and also in the culture supernatants of neutrophils (24h) and mononuclear cells (48h), previously stimulated with LPS (1 μ g/ml). Elevated serum concentrations of IL-6 (p<0.01) and IL-8 (p<0.05), and TNF- α (p=0.086) were found in patients (n=45) compared to controls (n=13), also detected in the invasive group (n=22) p<0,05) than controls. In the supernatants of neutrophils, it was detected higher production of IL-10 (p<0.05) and TNF- α (p=0.057) in patients (n=11) than controls (n=7) and also in the invasive group (n=5; p<0.05). No significant differences were detected in NO metabolites in serum samples of patients (p=26) compared with controls (n=29), but the analysis by staging showed a significant increase for the microinvasive group (n=4; <0.05). In the supernatants of leucocytes, a differential production of NO was observed. Neutrophils showed reduced concentrations of nitrite in patients (n=11; p<0.01) and also in CIN and Invasive groups compared to controls (p<0,05), while increased concentrations of nitrite were found in the culture supernatants of mononuclear cells in both the total group of patients (n=11; p<0.01) and in CIN and Invasive groups (p<0.05). To strengthen these data, the chemotactic function of neutrophils and the production of mediator was also evaluated after surgical treatment. Control neutrophils (n=5) incubated with serum obtained from NIC group after surgery had significant migration towards fMLP, LTB₄ and IL-8 than random migration, demonstrating restoration of the chemotactic ability. Serum concentrations of TNF- α (p=0.052), IL-6, IL-8 and IL-10 (p<0.05) were reduced after surgery compared to pretreatment (n=19). These differences were also detected in NIC group for IL-6 (p<0.05) and IL-8 (p= 0.076), and for IL-10 (p=0.073) in the Invasive group. The concentrations of NO metabolites were also reduced

in patients (n=26; p<0.05) and NIC group (n=13; p<0.05) after treatment compared to the pre-treatment levels. No significant alterations were detected in the production of group cytokines and NO in the culture supernatants of neutrophils and mononuclear cells, considering surgical treatment. Taken together, the results demonstrate that patients with cervical uterine neoplasia, apart from pre-invasive stage, produce circulating mediators such as IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α and NO, able to inhibit the migration of neutrophils to the inflammatory site. These mediators can be produced by circulating leucocytes, and possibly by tumor cells, since their removal reverted the reported events. Moreover, data indicate an impairment of inflammatory response at very early stages of cervical cancer.

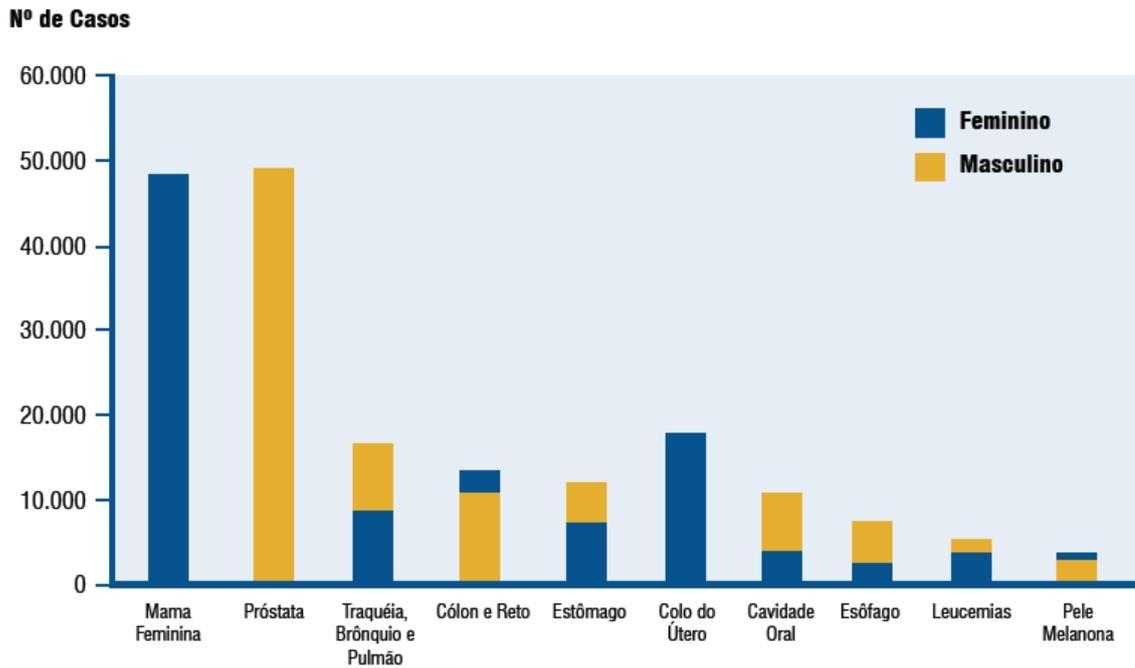
Keywords: cervical cancer, tumor staging, neutrophils, cell migration, cytokines, nitric oxide.

1. Introdução

1.1 Neoplasia de colo uterino – Etiologia e fatores de risco

Existem algumas estratégias eficazes para a prevenção do câncer de colo uterino, porém esta doença continua sendo considerada um grave problema de saúde pública, é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo, responsável, anualmente, por aproximadamente 500 mil novos casos e pelo óbito de 230 mil mulheres por ano (MS/INCA, 2009). As taxas de mortalidade são significativamente menores que as de incidência, sendo a razão mortalidade/incidência de 55% (PARKIN *et al.*, 2005). No Brasil, esse tipo de câncer aparece como o terceiro mais comum na população feminina, atrás apenas das neoplasias malignas de pele do tipo não melanoma e do câncer de mama (**Figura 1**). O número de novos casos de câncer de colo do útero esperados para o Brasil em 2008 foi de 18.680, com um risco estimado de 19 casos a cada 100 mil mulheres. Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo uterino é o tipo mais incidente na Região Norte (22/100.000 mulheres) e o segundo mais freqüente nas Regiões Sul (24/100.000 mulheres), Centro-Oeste (19/100.000 mulheres) e Nordeste (18/100.000 mulheres). Em Minas Gerais e Belo Horizonte, a taxa estimada para o câncer cervical, para o ano de 2008, foi de 13,48 casos para cada 100 mil mulheres (MS/INCA, 2009).

A incidência do câncer de colo uterino torna-se evidente na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até alcançar um pico geralmente entre 45 e 49 anos (MS/INCA, 2009). Estudos em países onde existe uma excelente taxa de notificação para o carcinoma *in situ* mostram que o pico desta lesão ocorre 20 a 30 anos mais cedo do que o câncer invasivo, e a maior parte dos casos de carcinoma *in situ* ocorrem na idade reprodutiva, entre 15 e 50 anos (ALEIXO NETO, 1991).



Fonte: MS/Instituto Nacional de Câncer - INCA

Figura 1. Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2008, exceto pele não melanoma, na população brasileira. Fonte: MS/INCA 2009

Mulheres

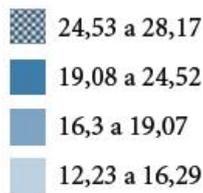


Figura 2. Representação espacial das taxas brutas de incidência da neoplasia de colo uterino por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação. Fonte: MS/INCA 2009.

A etiologia da neoplasia do colo uterino ainda não está totalmente esclarecida, porém desde a década de sessenta, tem-se relacionado esta neoplasia com agentes infecciosos de transmissão sexual (BAUER *et al.*, 1999; MUNZÕ *et al.*, 1994). Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de colo uterino destaca-se a infecção pelo papiloma vírus humano (HPV), pois em 99,7% das neoplasias invasivas do colo uterino é detectado DNA do HPV (PEREYRA *et al.*, 2003), principalmente dos tipos de HPV 16, 18, 31 e 33 (ELUF-NETO *et al.*, 1994).

Além do HPV, outros fatores de risco são identificados para o câncer de colo de útero, tais como: tabagismo (diretamente relacionado à quantidade de cigarros fumados), baixa ingestão de vitaminas, multiplicidade de parceiros sexuais, iniciação sexual precoce, higiene íntima inadequada e uso prolongado de contraceptivos orais. A prevenção primária do câncer do colo de útero pode ser realizada por meio do uso de preservativos durante a relação sexual, uma vez que a prática de sexo seguro é uma das formas de evitar o contágio pelo HPV (MS/INCA, 2009).

A principal estratégia utilizada para detecção precoce da doença (estima-se uma redução de cerca de 80% da mortalidade por este câncer através do rastreamento de lesões precursoras ou de carcinoma *in situ*), no Brasil, é através da realização do exame de Papanicolaou. Este teste, combinado com o teste de HPV colhido por profissional de saúde, mostrou ser a estratégia mais efetiva (maior número de casos detectados) para a detecção precoce da neoplasia de colo uterino, em um estudo de custo-efetividade realizado pelo INCA. Porém, pelo seu alto custo, torna-se incompatível com a realidade brasileira (INCA, 2009).

A transformação maligna do epitélio do colo uterino, normalmente, é um processo lento, que passa pelos estádios (facultativo) de displasia e carcinoma *in situ* (neoplasia

intraepitelial cervical, NIC I, II e III), até o carcinoma invasivo. A maioria das neoplasias cervicais invasivas (90-95%) deriva do epitélio escamoso e 2-8% do epitélio colunar. Por definição, a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) é pré-invasiva e limitada ao epitélio. Existem três estádios de desenvolvimento. O primeiro é a transição de NIC II a NIC III, quando a possibilidade de reversão da displasia é menor. O segundo é o início do crescimento invasivo (estádio IA1) com invasão estromal microscópica inferior a 5 mm de profundidade e 7 mm de largura do estroma cervical subjacente. Apesar da diferença na classificação de não-invasivo e microinvasivo, esses estádios possuem conduta terapêutica semelhante. A terceira é a transformação de microcarcinoma (estádio IA1) para doença franca (estádio IB), invadindo além do útero, mas não a parede pélvica ou o terço inferior da vagina, quando a lesão desenvolve potencial metastático (SELLORS *et al.*, 2003).

As neoplasias invasivas do colo uterino são em geral precedidas por uma longa fase de doença pré-invasiva. Pela análise microscópica, vários eventos celulares ocorrem que vão caracterizar a progressão das neoplasias cervicais, estes vão desde a atipia celular e a graus variados de displasia antes de chegar ao carcinoma invasivo. O conceito e a caracterização das lesões pré-neoplásicas do colo uterino iniciou ao fim do século XIX, quando foram observadas amostras teciduais da cérvix que apresentavam áreas de alterações epiteliais atípicas adjacentes às áreas invasivas. A terminologia carcinoma “*in situ*” (CIS) foi utilizada pela primeira vez em 1932 por Broders, para indicar aquelas lesões em que as células atípicas e indiferenciadas ocupavam a toda a espessura do epitélio, sem romper a membrana basal. Posteriormente a essas observações, é que se verificou a associação entre o carcinoma *in situ* e a neoplasia invasiva. E somente no final dos anos 50 é que o termo displasia foi utilizado para designar a atipias no tecido epitelial cervical que se mostravam intermediárias entre o epitélio normal e o carcinoma “*in situ*” (REAGAN *et al.*, 1953). Um sistema de nomenclatura em classes foi criado a partir de vários estudos de

acompanhamentos citológicos, colposcópicos e histológicos, de pacientes com lesões cervicais, sendo possível estabelecer uma correlação direta entre o grau de comprometimento da espessura do epitélio cervical com a progressão das lesões. Com base nos dados supracitados, Richart em 1986, sugeriu que o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC) fosse utilizada para indicar uma variedade de atipia celular, porém, limitada à espessura do epitélio. Com isso, a NIC foi dividida em graus I, II e III. A NIC I correspondia ao mesmo grau de comprometimento da displasia leve, a NIC II ao da displasia moderada e a NIC III à displasia grave e carcinoma *in situ* (MAGGI *et al.*, 1989). Na década de 80 algumas alterações celulares observadas com frequência em cortes histológicos de lesões cervicais, tal como a coilocitose ou atipia coilocítica, foi associada à infecção do papiloma vírus humano. Coilócitos são células atípicas resultantes dos efeitos citopatológicos dos vírus HPV's sobre as células infectadas. Essa alteração é caracterizada por um halo ou auréola perinuclear com bordas bem delimitadas, a presença desta alteração já caracteriza uma infecção por HPV, portanto, a coilocitose é um efeito patognômico do vírus nas células hospedeiras. Estas descobertas propiciaram na próxima década, a criação de um sistema de classificação histológica simplificada em dois graus da lesão: NIC de baixo grau que incluía anomalias compatíveis com atipia coilocítica e lesões de NIC I e NIC de alto grau que compreendia a NIC II e III. Dessa forma, as lesões caracterizadas de alto grau foram consideradas como sendo as precursoras da neoplasia invasiva (RICHART, 1990). No ano de 1988, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos realizou um simpósio para tentar padronizar nomenclatura para os diagnósticos de citopatologia cervical (Relatório do Simpósio de NIC, 1989; SOLOMON, 1989; KURMAN *et al.*, 1991). Após três anos, um novo encontro foi realizado, e as sugestões e as observações destes dois simpósios ficaram conhecidas como Terminologia do Sistema de Bethesda (TSB) (Relatório do Simpósio de NIC, 1992). A criação da Terminologia do Sistema de

Bethesda foi baseada em dados citológicos, porém pode também ser usado para caracterização de cortes histológicos, pois agora se passou a incluir ao grau da lesão (baixo ou alto) o tipo de epitélio (escamoso), então a partir do simpósio de 1991, foi instituído o termo: lesão intraepitelial escamosa (SIL), sendo esta nomenclatura dividida em duas classes de acordo com o grau da lesão: lesões de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL) (KURMAN *et al.*, 2004). A classificação de TBS também inclui alterações coilocíticas e NIC de baixo grau (NIC I) em LSIL, enquanto a HSIL compreendem NIC mais avançada, como NIC II e III. O termo lesão se manteve, pois as alterações citopatológicas e morfológicas, não necessariamente indicam ou identifica um processo neoplásico (KURMAN *et al.*, 1994). Em 2001, uma nova reunião de Bethesda foi realizada, e mais alterações foram realizadas na TSB (SOLOMON *et al.*, 2002; EVANS, *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2006). A principal modificação em relação às células escamosas alteradas ocorreu com a divisão do termo ASCUS. A idéia era criar uma terminologia universal das alterações ocorridas no colo uterino, porém sem deixarem de incluir algumas alterações citológicas atípicas, ou seja, possuem alterações reativas (atípias) que fazem lembrar ao mesmo tempo alteração encontras em LSIL. Estas células foram caracterizadas em duas novas subcategorias: a ASC-US (atípias de células escamosas de significado indeterminado) e a ASC- H (atipia de células escamosas não podendo excluir lesão de alto grau) (SHERMAN *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2006). Segundo Souza *et al.*, (2004), as células atípicas de significado indeterminado tem importância clínica quando seguida então da letra H, indicativa de suspeita de HSIL. Permaneceram os termos: LSIL (compreendendo displasia leve/1 NIC I e alterações celulares associadas ao HPV) e HSIL (displasia moderada/NIC II, displasia severa, carcinoma *in situ*/NIC III) (SOLOMON *et al.*, 2002).

1.2. Resposta Inflamatória

A inflamação é uma resposta do organismo a diversos agentes lesivos, como por exemplo microorganismos, queimaduras, trauma físico ou células tumorais (DEJANA *et al.*, 1995). Os neutrófilos, também denominados leucócitos polimorfonucleares, graças aos seus núcleos morfológicamente diferenciados e multilobulados, são os mais numerosos dentre os granulócitos presentes no sangue periférico, representando cerca de 50-60% dos leucócitos circulantes. Estas células respondem rapidamente aos estímulos quimiotáticos, realizam funções fagocitárias e é a população celular principal na resposta inflamatória (ABBAS *et al.*, 1995). Após sua migração, os neutrófilos são ainda capazes de liberar mais mediadores, o que promove a amplificação da resposta inflamatória (HEIT *et al.*, 2002). O recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação envolve uma seqüência de eventos (ativação, rolamento, adesão e transmigração), coordenada por moléculas de adesão expressas na superfície dos leucócitos e das células endoteliais, envolvidas na interação leucócito-endotélio (**Figura 3**).

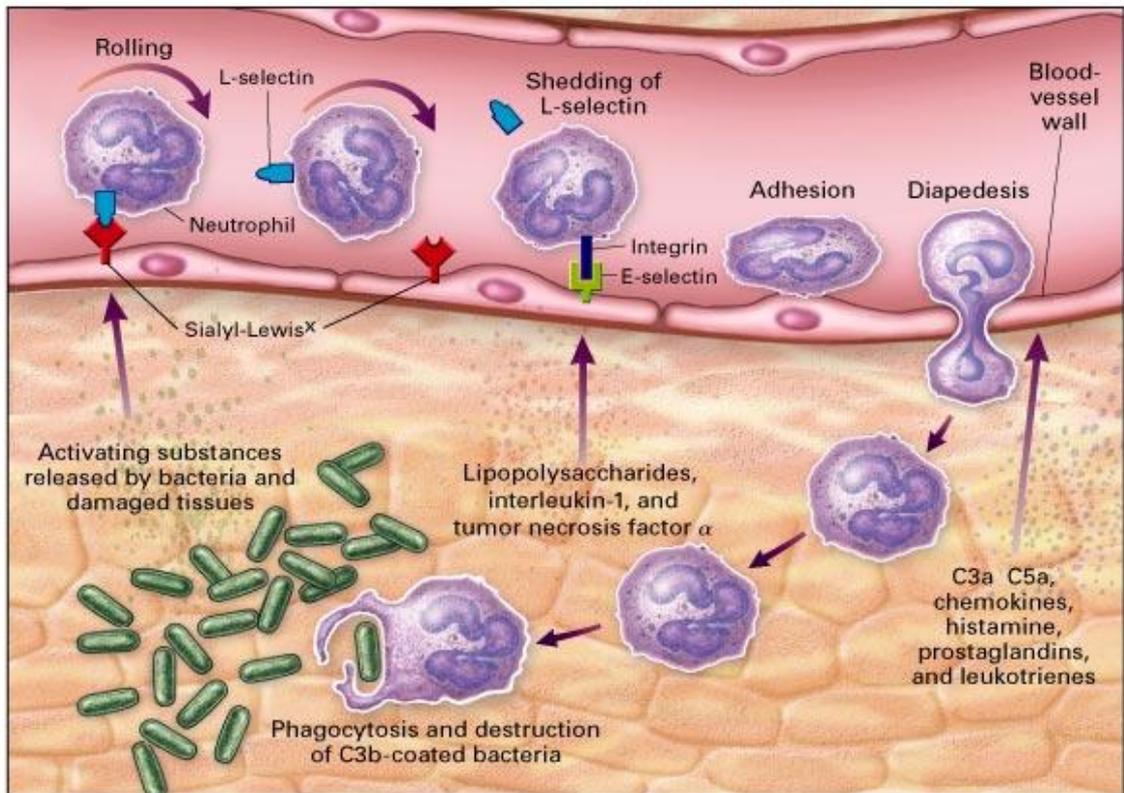


Figura 3. Sequência de eventos envolvidos no processo de transmigração celular. Modificado de Holgate ST, Church MK, Lichtenstein LM — *Allergy*, 2nd edition, London: Mosby, 2001.

O início do rolamento dos neutrófilos é mediado pela ligação reversível das glicoproteínas selectinas encontradas tanto no neutrófilo como no endotélio (SPERTINI *et al.*, 1991; KADONO *et al.*, 2002). Devido à expressão de outras glicoproteínas na superfície dos leucócitos, denominadas de integrinas, que reconhecem moléculas de adesão endoteliais (família das imunoglobulinas), ocorre a ligação de alta afinidade dos leucócitos ao endotélio. A Mac-1 é reconhecida como a integrina mais relevante na maioria dos modelos de resposta inflamatória com participação de neutrófilos, com sítios de ligação específicos nas células endoteliais (WAGNER *et al.*, 1999). Entre as células endoteliais, ocorre a transmigração do neutrófilo, que, para chegar ao local de lesão tecidual, se move em direção ao gradiente quimiotático representado por um excesso de mediadores (DITTMAR *et al.*, 2000).

A migração celular é um evento chave na resposta inflamatória de qualquer etiologia. Os leucócitos circulantes migram em resposta aos mediadores inflamatórios liberados no sítio de lesão, como os componentes do sistema complemento (C5a), os produtos derivados da via das lipooxigenases (LTB₄) e as quimiocinas (COUSSENS *et al.*, 2002). Grande parte destes agentes quimiotáticos, como a IL-8, fMLP, LTB₄ e C5a, ligam-se aos neutrófilos por receptores transmembrana específicos. Estes receptores ativam as proteínas G triméricas intracelulares, iniciando a sinalização que permitirá a essas células migrarem para os sítios inflamatórios. As quimiocinas, subdivididas em quatro famílias (CXC, CC, C e CX₃C), de acordo com a seqüência de resíduos de cisteína, podem controlar a evolução natural da resposta inflamatória, recrutando células efetoras específicas. Desta forma, a contínua produção de citocinas no sítio inflamatório torna-se importante para o desenvolvimento de uma doença crônica, incluindo uma neoplasia (WAHL *et al.*, 1998).

Para manter outras funções importantes dos leucócitos, como a fagocitose e atividade microbicida, é essencial que sua capacidade de migração esteja preservada (MacFADDEN *et al.*, 1985). A fagocitose é um evento celular complexo no qual partículas são reconhecidas, internalizadas e eliminadas. Consistindo na primeira linha de defesa do organismo na remoção de microorganismos, esse processo envolve o reconhecimento de antígenos por receptores de superfície nas células fagocíticas, iniciando a polimerização e a internalização de partículas externas ou organismos no fagossomo (ALLEN *et al.*, 1996). Além de microorganismos, a remoção de células em apoptose ocorre por fagocitose (FRANK *et al.*, 1999). Na superfície do fagócito são expressos vários receptores capazes de reconhecer e decodificar seus ligantes cognatos, presentes na superfície de agentes infecciosos e células apoptóticas, e desencadear o englobamento (STUART *et al.*, 2005). Neste processo, ocorre interação de receptores de membrana com moléculas específicas

ligantes, localizadas na superfície de partículas. O complexo ligante-receptor estimula a reorganização local do cito esqueleto de actina submembranosa, que provê força para a internalização das partículas (KWIATKOWSKA *et al.*, 1999). A fagocitose é seguida pela fusão do fagossomo com lisossomos contendo enzimas digestivas, formando o fagolisossomo, seguindo-se a degradação da partícula. O remodelamento e a homeostase do número de células são outras funções para as quais a fagocitose foi adaptada. Desta forma, o excesso de células ou células danificadas, removidas durante o desenvolvimento, está diretamente relacionado com a apoptose ou morte programada de células (STUART *et al.*, 2005).

Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o sítio inflamatório e também os principais efetores da lesão tecidual, através da produção de proteases e radicais derivados do metabolismo do oxigênio e nitrogênio (KEEL *et al.*, 1997). Um possível papel antitumoral é proposto para os neutrófilos (KIM *et al.*, 2000; KOGA *et al.*, 2004).

1.3. Inflamação e Câncer

A resposta inflamatória normal (protetora), isto é, que promove reparação tecidual, é auto-limitada. Qualquer fator desregulador deste processo pode ser patogênico, como acontece nas inflamações crônicas e no câncer. Portanto, dependendo do contexto, as células inflamatórias podem ter papel benéfico e/ou prejudicial, estando envolvidas na patogênese de diversas doenças, incluindo as neoplasias (COUSSENS *et al.*, 2002).

Virchow, em 1863, sugeriu que o câncer se origina a partir de sítios de inflamação crônica, aliado a fatores que aumentam a proliferação celular (BALKWILL *et al.*, 2001). A manutenção desta proliferação em um ambiente rico em células inflamatórias, fatores de crescimento e agentes promotores de alterações no DNA celular certamente promove ou potencializa as chances do surgimento de um câncer. Durante a inflamação normal, as células se multiplicam enquanto o tecido é regenerado e cessam a proliferação quando o agente inflamatório é removido e o tecido reparado. No entanto, se as células em multiplicação contêm mutações em seu DNA, elas continuam a proliferar em ambientes propícios, facilitado por fatores de crescimento que dão suporte ao seu desenvolvimento (COUSSENS *et al.*, 2002).

Muitos tumores de origem epitelial contêm leucócitos infiltrantes no próprio estroma (NEGUS *et al.*, 1997) e nos líquidos neoplásicos (MANTOVANI *et al.*, 1997). O infiltrado inflamatório de um tumor pode incluir populações de diferentes leucócitos como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, mastócitos e linfócitos, todos sendo capazes de produzir diversos tipos de mediadores (WAHL *et al.*, 1998).

Um provável estímulo para o recrutamento de leucócitos no microambiente tumoral é a produção local de quimiocinas (NEGUS *et al.*, 1995). Ainda, é provável que esses

mediadores regulem também a migração da maioria de células neoplásicas humanas (ROSSI *et al.*, 2000).

1.4. Alterações de Funções de Leucócitos no Câncer

O comprometimento das funções de leucócitos em doenças ilustra a importância destas células e as coloca como alvo terapêutico em diferentes condições. Em doenças infecciosas, os neutrófilos desempenham um papel fundamental como células de defesa para o controle da disseminação do microorganismo. Pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida apresentam infecções de repetição causadas principalmente por fungos e bactérias. Nesses pacientes ocorre diminuição da capacidade de migração de neutrófilos e monócitos e redução na capacidade oxidativa dos neutrófilos (ELBIM *et al.*, 1995). O uso de drogas antiretrovirais melhora a resposta imune mediada por células ao longo do tratamento, principalmente o índice de quimiotaxia, e com isso reduz a incidência de infecções oportunistas (MASTROIANNI *et al.*, 1999).

Pacientes com sepse de diferentes origens podem apresentar alterações em funções de neutrófilos (DONG *et al.*, 1993). Foi demonstrada redução significativa na função quimiotática de neutrófilos em pacientes não sobreviventes, o que sugere que este tipo de disfunção pode estar associado ao pior prognóstico da sepse (TAVARES-MURTA *et al.*, 2002). Mediadores sistêmicos como as citocinas e o óxido nítrico (NO) estão envolvidos no fenômeno de inibição da migração de neutrófilos na sepse. Em modelo de endotoxemia (TAVARES-MURTA *et al.*, 2001) ou sepse induzida por ligadura e perfuração cecal (BENJAMIM *et al.*, 2000) a administração de inibidor seletivo da síntese de NO, aminoguanidina, preveniu a falência da migração de neutrófilos, demonstrando a participação do NO na inibição da migração de neutrófilos (TAVARES-MURTA *et al.*,

2001; BENJAMIM *et al.*, 2000). Em reforço, concentrações plasmáticas de citocinas, quimiocinas e NO estão aumentadas na sepse humana (GOGOS *et al.*, 2000; TAVARES-MURTA *et al.*, 2001) e a administração de fator de necrose tumoral (TNF)- α ou interleucina (IL)-8 inibe a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório por mecanismo sensível aos inibidores de NO sintase (TAVARES-MURTA *et al.*, 1998).

Pacientes com câncer também podem apresentar aumento na incidência e/ou gravidade de infecções, provavelmente causados por alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro e/ou por drogas utilizadas no tratamento da mesma (PICKERING *et al.*, 1978). Em pacientes com câncer gastrointestinal, foi observada redução da função quimiotática de neutrófilos, comparada a voluntários sadios no momento do diagnóstico (DUIGNAN *et al.*; 1986). Neutrófilos obtidos do sangue de pacientes com câncer de pulmão apresentam reduzida atividade citotóxica, demonstrada mediante a redução da produção de radicais superóxidos por essas células (HARA *et al.*, 1992).

Em mulheres com câncer ginecológico de diferentes origens, incluindo o colo uterino, foi encontrada redução na produção de radicais superóxidos, já em estádios iniciais e de forma mais marcada com a evolução da doença. Não está claro se as alterações na produção de superóxidos apresentam relação causal ou se seriam consequência do desenvolvimento da doença (PÓKA *et al.*, 2000). Neste contexto, um estudo prospectivo, que avaliou funções de neutrófilos e monócitos em pacientes com câncer de mama, demonstrou que, após seguimento de 3 anos, o grupo com alterações funcionais detectadas no momento do diagnóstico revelou pior prognóstico (LUKAC *et al.*, 1994).

Em pacientes com infecção pelo HPV, a taxa de regressão de lesões intraepiteliais de baixo grau associadas ao vírus foi dependente da atividade das células “natural killer” (NK). Mulheres com resposta reduzida de citotoxicidade natural apresentavam displasias persistentes enquanto pacientes com lesões que regrediram tinham aumento significativo da

atividade de células NK durante o acompanhamento (GARZETTI *et al.*, 1995). Além disso, foi descrita redução no número de células de Langherans em lesões pré-malignas positivas para HPV 16 e 18, sugerindo que fatores induzidos pelos vírus podem levar à redução da apresentação antigênica na área infectada pelo HPV (THORLAND *et al.*, 2000).

Recentemente demonstramos alterações no número e funções de neutrófilos circulantes obtidos de pacientes com câncer invasivo de colo uterino, comparado ao grupo em estadiamentos iniciais (lesão pré-invasiva e microinvasiva) e ao grupo controle, sugerindo a participação dos neutrófilos na resposta imune contra o câncer de colo uterino. Ainda, no grupo em estadiamento não invasivo/micro-invasivo, a retirada cirúrgica do tumor aumentou a migração dos neutrófilos, sugerindo que as células tumorais poderiam estar produzindo mediadores solúveis capazes de inibir a migração das células circulantes (FERNANDES Jr *et al.*, 2007).

2. Hipótese

Pacientes com neoplasia de colo uterino, inclusive em estadiamentos iniciais, produzem fatores circulantes capazes de inibir a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório.

3. Objetivos

Avaliar mecanismos envolvidos na redução da função quimiotática de neutrófilos em pacientes com neoplasia de colo uterino, através dos seguintes procedimentos:

1. Avaliação do efeito do soro de pacientes com neoplasia de colo uterino em diferentes estadiamentos sobre a migração de neutrófilos normais, pré e após tratamento cirúrgico;
2. Quantificação da produção sistêmica de mediadores TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 e NO em diferentes estadiamentos, nos períodos pré e após tratamento cirúrgico;
3. Quantificação da produção de mediadores TNF- α , IL-6, IL-10 e NO em sobrenadantes da cultura de neutrófilos e células mononucleares em diferentes estadiamentos, nos períodos pré e após tratamento cirúrgico.

4. Metodologia

4.1. Pacientes e Controles

Foram estudadas pacientes atendidas no Ambulatório de Oncologia Ginecológica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), com diagnóstico de lesão neoplásica de colo uterino, em diferentes estadiamentos da doença: grupo Não Invasivo (NIC), grupo Microinvasivo e grupo Invasivo. O diagnóstico foi realizado através de história, exame clínico e ginecológico (incluindo toque retal para avaliação de parâmetros), citologia oncológica e colposcopia, e confirmado por biópsia de colo uterino.

O estadiamento foi baseado nas regras da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), um sistema de classificação clínica baseado no tamanho do tumor e extensão da doença na pelve, em que o grau do crescimento da neoplasia é avaliado clinicamente e pela utilização de outros exames para categorizar os estádios da doença de I a IV. O estágio I corresponde ao tumor localizado ao colo uterino (sendo classificado como Microinvasivo estádios IA1 ou IA2), enquanto que o estágio IV corresponde à fase de crescimento na qual a neoplasia se disseminou a órgãos à distância por metástase. Lesões pré-invasivas correspondem ao estágio 0 (zero) ou NIC (carcinoma *in situ*) (BENEDET *et al.*, 2000). Foram considerados critérios de exclusão pacientes submetidas a tratamento anterior ou em uso de drogas imunossupressoras.

Os controles foram mulheres voluntárias sadias, isto é, sem doença diagnosticada, que não foram submetidas a tratamento de doenças relacionadas ao colo uterino nos últimos 5 anos, e que não estiveram em uso de droga imunossupressora, abordadas quando da realização da coleta de sangue.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (Protocolos números 445, 933 e 1054). O “Termo de Esclarecimento e Consentimento para participação da pesquisa” foi lido e assinado pelas voluntárias e pacientes (**Anexo I**).

4.2. Coleta de Sangue

Foram coletadas amostras de sangue venoso periférico de pacientes com neoplasia de colo uterino em diferentes estadiamentos, utilizando material descartável e esterilizado, seguindo todos os princípios de assepsia, em dois momentos distintos: (1) após diagnóstico e antes de qualquer tipo de tratamento, (2) 30 a 60 dias após cirurgia.

Em cada tempo foram coletadas duas amostras contendo 5 mL de sangue/amostra, sendo uma sem anticoagulante, utilizada para a coleta de soro, e outra com heparina (100 U/mL) utilizada para purificação de neutrófilos.

O mesmo procedimento técnico foi realizado para a coleta de sangue das voluntárias sadias, em um só tempo.

4.3. Avaliação da função quimiotática de neutrófilos circulantes

4.3.1. Obtenção e preparo dos neutrófilos circulantes

Os neutrófilos presentes no sangue venoso coletado de controles foram isolados através do meio Histopaque (densidade 1,119), utilizado de acordo com as instruções do fabricante (Sigma Chemical, St. Louis, MO). O sangue coletado foi adicionado a um tubo contendo Histopaque, na proporção de 5,0 ml sangue/4,5 ml Histopaque. Os tubos foram centrifugados (150 x g), em temperatura ambiente, até a completa separação das bandas celulares (**Figura 4**). A camada de neutrófilos foi coletada com o auxílio de micropipeta, e, a seguir, as células foram lavadas com meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) contendo soro albumina bovina (BSA) 0,01%, por meio de centrifugação (150 x g, 10 min, temperatura ambiente), procedimento que foi repetido outras duas vezes. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1,0 ml do mesmo meio. A viabilidade celular foi avaliada pela técnica de exclusão com azul de tripan, sendo utilizadas amostras com mais de 95% de viabilidade.

Foi realizada a contagem total e diferencial das células purificadas. Para a contagem total, 20 µl da solução de células foram adicionados à solução de Turk (400 µl), e as células foram contadas em câmara de Neubauer. A citologia diferencial foi feita em lâmina preparada com 20 µl da solução de células em citocentrífuga (150 x g, 5 min, Cito-Spin). A lâmina foi corada (corante de Rosenfeld) e observada em microscópio de luz com objetiva em óleo de imersão (100x). Foram contadas 100 células, diferenciando-se os tipos celulares; mononucleares, neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Uma solução final de neutrófilos foi preparada contendo 2×10^6 neutrófilos/ml RPMI-BSA.

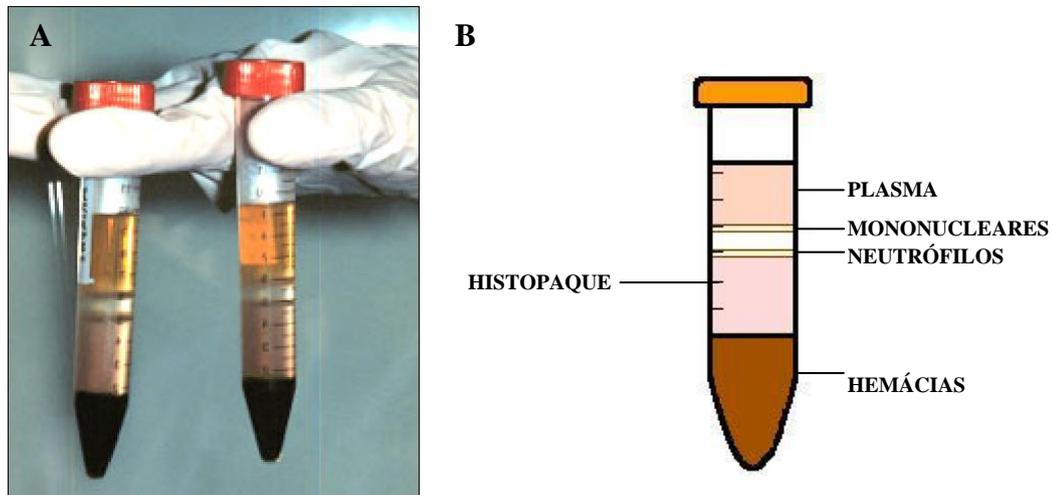


Figura 4. Separação de leucócitos a partir do sangue total contendo anticoagulante. **A.** Tubos de centrifuga mostrando as camadas das subpopulações de leucócitos isolados; **B.** Esquema demonstrativo da purificação de células mononucleares.

4.3.2. Tratamento de neutrófilos normais com soro de pacientes

Para avaliar um possível efeito do soro obtido de pacientes com neoplasia de colo uterino sobre a função quimiotática de neutrófilos normais, estas células purificadas foram incubadas na presença de soro diluído em RPMI-BSA (concentrações 0,5%, 5% e 50%) durante 30 minutos, a 37° C e 5% de CO₂. Esse procedimento foi realizado com soro obtido de pacientes antes e após tratamento cirúrgico. Como grupo controle, células obtidas de mulheres normais foram também incubadas com soro heterólogo normal, seguindo o mesmo procedimento. Após esse tempo foi realizado o ensaio de quimiotaxia utilizando a microcâmara de quimiotaxia (**Figura 5**).

4.3.3. Ensaio de quimiotaxia

A quimiotaxia foi efetuada em microcâmara de 48 poços (Neuro Probe, Cabin John, MD), separados por membrana de policarbonato com poros de 5 μ m de diâmetro (**Figura 5**). Na câmara inferior, foram colocados 28,5 μ l do meio de cultura RPMI-BSA 0,01% (controle) ou de um dos estímulos quimiotáticos: fMLP, LTB₄ ou IL-8, diluídos em RPMI-BSA.

Foi realizado um ensaio inicial para avaliar o grau de migração de neutrófilos induzida por diferentes concentrações dos estímulos quimiotáticos. Para isso, foram utilizados neutrófilos obtidos de voluntárias sadias e foi quantificada a resposta quimiotática de neutrófilos frente a diferentes concentrações (10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} M) das substâncias quimioatraentes. A **Figura 6** mostra o número de neutrófilos emigrados em resposta ao fMLP, LTB₄ e IL-8, sendo que a concentração de 10^{-7} M foi selecionada para uso nos demais experimentos.

Uma solução (50 μ l) de células purificadas ($1,0 \times 10^6$ células/ml) tratadas com soro de pacientes com neoplasia de colo uterino ou soro normal foi colocada na câmara superior. O ensaio foi feito em duplicata para cada uma das concentrações. As câmaras foram incubadas por 60 min, a 37°C e 5% CO₂. Em seguida, a membrana de policarbonato foi removida, fixada e corada (kit de coloração Hema 3 Stain set, Biochemical Sciences, Bridgeport, NJ).

O número de células emigradas para a parte inferior do filtro foi contado (objetiva 100x) em 10 campos aleatórios (**Prancha 1**). Os resultados foram expressos com número de neutrófilos por campo. As células que migraram em direção aos estímulos quimiotáticos foram consideradas como migração direcionada, e as células que migraram em direção ao RPMI foram caracterizadas como controle (migração randomizada ou aleatória).



Figura 5: Microcâmara de quimiotaxia: os neutrófilos (1×10^6 células/ml) foram colocados na câmara superior e os estímulos quimiotáticos (10^{-7} M) fMLP, LTB₄ e IL-8 na câmara inferior.

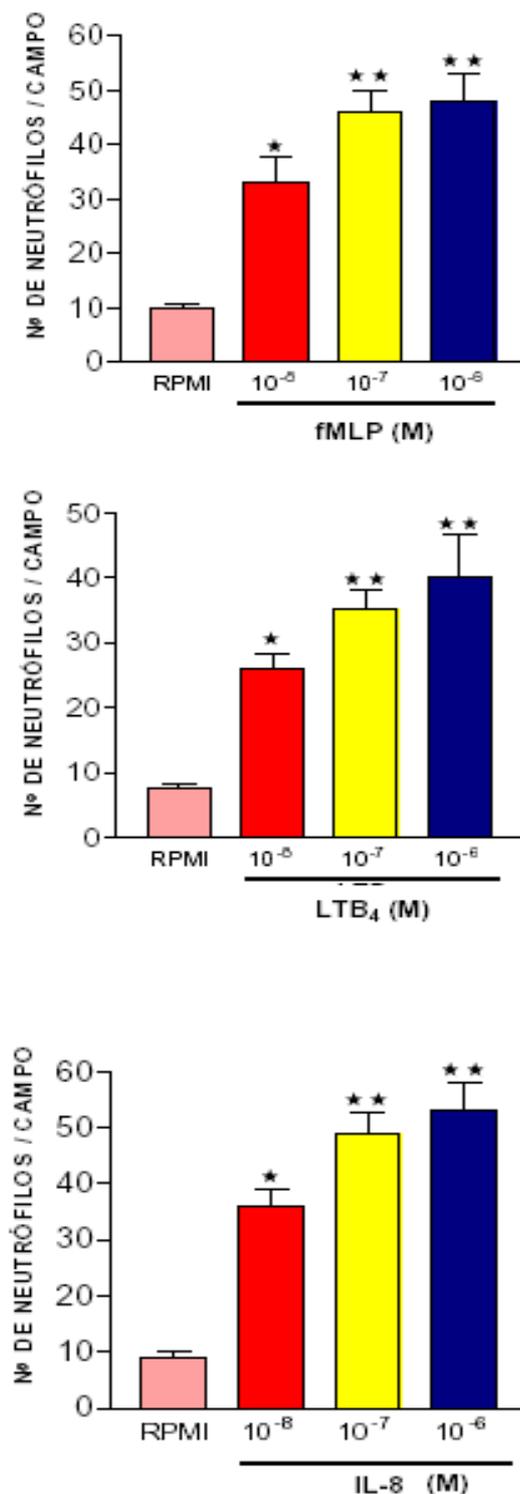


Figura 6. Curva dose-efeito do número de neutrófilos emigrados. As barras indicam a migração de neutrófilos, obtidos de voluntárias, em resposta a diferentes concentrações (10^{-6} , 10^{-7} ou 10^{-8} M) de fMLP, LTB₄ ou IL-8. O meio de cultura RPMI foi utilizado como controle. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ comparado ao RPMI (ANOVA + Teste de Bonferroni).

Prancha 1.

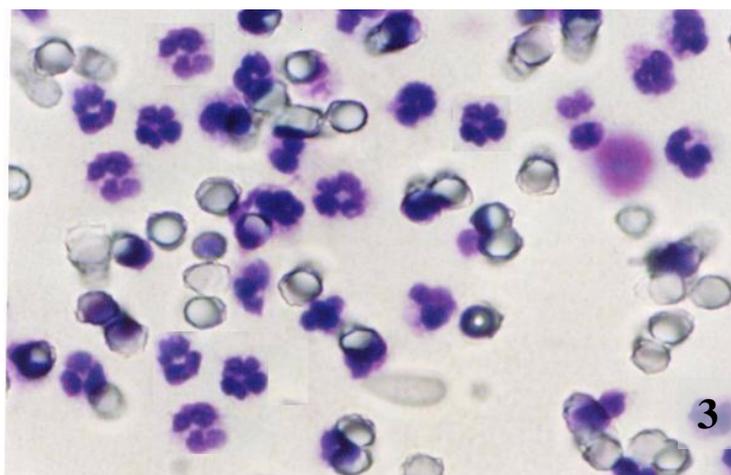
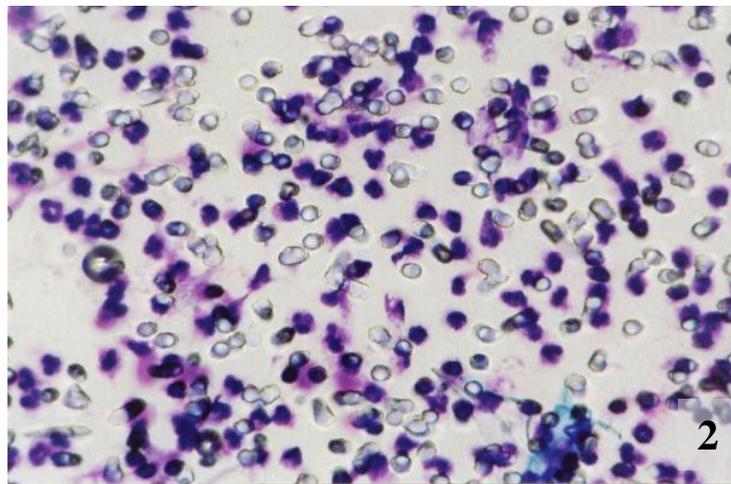
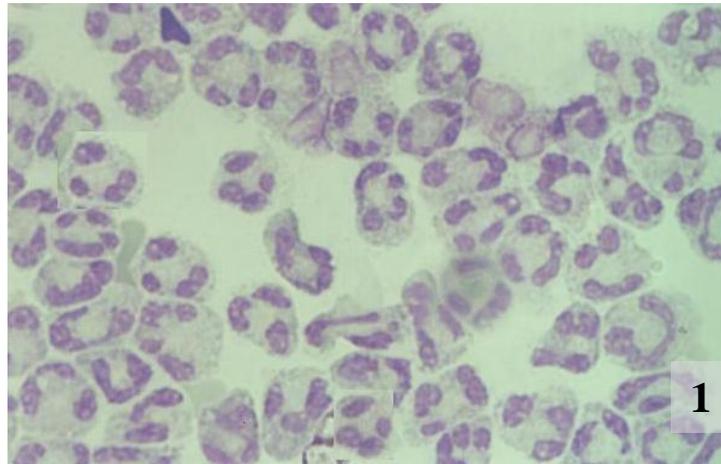


Foto 1. Neutrófilos Purificados com Meio Histopaque 1119 (coloração de Rosenfeld 1000x).

Foto 2. Quimiotaxia de Neutrófilos (coloração de Rosenfeld 100x).

Foto 3. Quimiotaxia de Neutrófilos (coloração de Rosenfeld 1000x).

Microscópio OLYMPUS CH-30, Laboratório de Farmacologia, UFTM.

4.4. Cultura de leucócitos para avaliação da produção de mediadores inflamatórios

Para avaliar a produção de mediadores inflamatórios por leucócitos circulantes obtidos de controles e de pacientes com câncer de mama antes e após tratamento, neutrófilos e células mononucleares ($1 \times 10^6/\text{ml}$) purificados foram estimulados ou não com endotoxina (LPS E.coli, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$) e incubados (37°C , 5% de CO_2) durante 24 e 48 horas em placas de 96 poços. Após cada tempo, as amostras foram transferidas para tubos de centrifuga e a viabilidade celular foi determinada por exclusão em azul de Tripan. Em seguida, a solução foi centrifugada (10 min, 1500 rpm) e os sobrenadantes foram coletados e estocados (-70°C) em amostras de $200 \mu\text{l}$, até a dosagem dos mediadores realizada através da reação de Griess ou de ensaio imunoenzimático.

4.5. Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas

O soro dos controles e das pacientes foi obtido por centrifugação (1500 rpm durante 10 min) do sangue total (amostra sem anticoagulante) e estocado em alíquotas de $200\mu\text{l}$ em freezer (-70°C), até o dia do experimento. As concentrações de $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-8 e IL-10 nas amostras de soro ou de sobrenadantes da cultura de leucócitos foram determinadas por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Para a captura de anticorpos, placas de 96 poços foram revestidas com $50 \mu\text{l}$ /poço do anticorpo específico para cada uma das citocinas acima, diluídos (1 a $3 \text{ mg}/\mu\text{l}$) em solução tampão de ligação (Na_2HPO_4) e incubados por 16-24 h em temperatura de 4°C . As placas foram então lavadas (PBS/Tween 20 0,05%) três vezes e a ligação não - específica foi bloqueada (2 h, 37°C) com PBS/BSA 1% ($100 \mu\text{l}/\text{poço}$). As amostras e padrões (curva padrão) foram colocados nas placas (50

µl/poço) e incubados por 16-24 h a 4°C. Para a curva padrão foram utilizados anticorpos recombinantes humanos previamente diluídos em PBS/Tween 20 (2,5 a 10 mg/mL). As placas foram lavadas e, em seguida, foi adicionado anticorpo anti-citocina biotilado (0,5 a 1 mg/mL) diluído em tampão de bloqueio (PBS/BSA 1%). Após 1 h de incubação (37°C), as placas foram lavadas (PBS/Tween 20) e o conjugado avidina-peroxidase previamente diluído em tampão de bloqueio (1:5000) foi adicionado (100 µl /poço). A placa foi novamente incubada por 30 min em temperatura ambiente. Após este período de tempo as placas foram lavadas e, em seguida, foi realizada a reação de coloração adicionando-se o substrato o-fenilenediamina dihidroclorato - OPD (100 µl). As placas foram então incubadas em temperatura ambiente por 15 a 20 min. A reação foi interrompida com H₂SO₄ (50 µl, 1M) e a absorbância medida a 490 nm em leitor de placa de ELISA. Os resultados foram expressos em picogramas de cada citocina por mililitro de soro ou sobrenadante (BENJAMIM *et al.*, 2000).

4.6. Ensaio colorimétrico para quantificação de metabólicos de óxido nítrico

A quantificação do nitrato em amostras de soro obtidas de controles e pacientes foram determinadas por meio da redução enzimática do nitrito com o nitrato redutase, conforme descrito (SCHMIDT *et al.*, 1989). As amostras (40 ml) foram incubadas com o mesmo volume de tampão redutase (fosfato de potássio 0,1M, pH 7,5; contendo 1 mM de fosfato de nicotinamida adenina dinucleotideo-NADPH, 10 mM de flavina adenina dinucleotideo-FAD e 4U de nitrato redutase/ml) durante 20 h a 37°C. Uma curva padrão de nitrato foi determinada por incubação de nitrato sódico (10 a 200 mM) com tampão. A quantidade total de metabólicos de NO foi então determinada pelo ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess (GREEN *et al.*, 1981). O mesmo procedimento foi utilizado para a quantificação de nitrito em amostras de sobrenadante, exceto a utilização da enzima nitrato redutase. A absorvância foi medida a 546 nm. Os resultados foram expressos como μM de nitrato (NO^{-3}) + nitrito (NO^{-2}).

4.7. Análise estatística

Os resultados foram avaliados através do programa *SigmaStat 3.1*[®], *GraphPad*, *Prisma*

4. Diferenças entre 2 grupos não pareados foram comparadas através de teste t ou Mann-Whitney, de acordo com a distribuição paramétrica e não paramétrica, respectivamente. Diferenças entre 3 ou mais grupos não pareados foram comparadas através do teste de ANOVA seguido do teste de Tukey, em caso de distribuição paramétrica; ou pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, em caso de distribuição não paramétrica. Os resultados entre 2 grupos pareados (pré e pós tratamento) foram comparados através de teste t pareado (distribuição paramétrica) ou Wilcoxon (distribuição não paramétrica). Os resultados foram expressos por medianas e percentiis 10, 25, 75 e 90. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

4.8. Preparo de meios de cultura, soluções, reagentes e drogas

4.8.1. Meios de cultura e soluções:

a) Meio de cultura RPMI-1640 simples, com glutamina, sem bicarbonato de sódio:

RPMI 1640 (Sigma)	10,4 g
Bicarbonato do sódio (Merck)	2,2 g
Água bidestilada e deionizada q.s.p.	1,0 l

O pH do meio foi acertado para 7,45 e a solução foi filtrada (filtros de Millipore 0,22 μ m) e armazenada em geladeira antes do uso.

b) Meio de cultura RPMI-1640 contendo BSA 0,01%:

O meio de cultura foi preparado conforme descrito no item **a**, acrescido de BSA fração V (Sigma), na concentração de 0,01g/100 ml, imediatamente antes do uso, e esterilizado por filtros Millipore 0,22 μ m antes do uso

c) Solução salina tamponada com fosfato 10x (PBS):

Cloreto de sódio P.A. (Merck)	80,0 g
Cloreto de potássio P.A. (Merck)	2,0 g
Fosfato de sódio dibásico P.A. (Merck)	11,5 g
Fosfato de potássio monobásico P.A. (Merck)	2,0 g
Água bidestilada e deionizada q.s.p.	1,0 l

O pH da solução final foi acertado para 7,45 com NaOH 0,1 N e a solução autoclavada (127°C) antes do uso.

4.8.2. Soluções e tampões utilizados durante a realização do ELISA

a) Solução salina tamponada com fosfato (PBS) 10X concentrada:

Cloreto de sódio P.A. (Merck)	80,0 g
Cloreto de potássio P.A. (Merck)	2,0 g
Fosfato de sódio dibásico P.A. (Merck)	11,5 g
Fosfato de potássio monobásico P.A. (Merck)	2,0 g
Água bi-destilada e deionizada q.s.p.	1,0 L

O pH da solução final foi acertado para 7,4 com NaOH 0,1 N e a solução autoclavada (127°C) antes do uso. Para realização dos ensaios a solução foi diluída em água Mili-Q na proporção 1:10.

b) Solução PBS contendo BSA 1% - tampão de bloqueio:

Para preparação do tampão de bloqueio foi utilizado PBS previamente diluído em água Mili-Q (1:10), acrescido de BSA fração V (Sigma), na concentração de 1 g/100 mL. A solução foi esterilizada por filtros Millipore 0,22 mm e preparada imediatamente antes do uso.

c) Solução tampão de ligação:

Fosfato de sódio dibásico P.A. (Merck) 0,1 Molar

Água bi-destilada e deionizada q.s.p. 1,0 L

O pH da solução final foi acertado para 9,0 e a solução foi armazenada em geladeira antes do uso.

d) Tampão substrato:

Acido cítrico (Merck) 4,7 mM

Fosfato de sódio dibásico P.A. (Merck) 66,7 mM

Água bi-destilada e deionizada q.s.p. 500,0 mL

O pH da solução final foi acertado para 5,0 com NaOH 0,1 N e a solução foi armazenada em geladeira antes do uso.

e) Solução PBS contendo Tween-20 0,05%

Para preparação da solução foi utilizado PBS previamente diluído em água mili-Q (1:10), acrescido de Tween-20 (Sigma), na concentração de 50 mL/100mL.

f) Substrato para reação de coloração

O-fenilenediamina diidrocloreto (Sigma) 0,4 mg

Água oxigenada (Merck) 0,4 mL

Tampão substrato q.s.p. 1,0 mL

A solução foi preparada imediatamente antes do uso.

4.8.3. Estímulos quimioatraentes

- a) fMLP (Sigma): a solução-mãe foi preparada na concentração de 5mg/ml, diluída em 10% de dimetil sulfoxido (DMSO, Sigma) e água estéril. A solução utilizada nos experimentos foi a seguir diluída em RPMI-BSA.
- b) LTB₄ ou IL-8 (Sigma): foram diluídos em RPMI-BSA para obter a concentração empregada.

4.8.4. Tampões e reagentes para dosagem de NO - Reação de Griess

a) Tampão de ensaio para a enzima nitrato redutase Para 10 mL:

NADPH (Sigma)	10,0 mg
Nitrato redutase (Sigma)	4,0 U
KH ₂ PO ₄ (pH 7,5; Merck)	4,0 mL (0,5 M)
Aquosa Mili-Q q.s.p.	10,0 mL

b) Reagente de Griess:**Solução “A”**

Sulfanilamida 2% (Sigma)	0,5 g
H ₃ PO ₄ 5% (Merck)	25,0 mL

Solução “B”

N-1-nafitil etilenodiamino dihidrocloro 0,2% (Sigma)	0,05 g
Água Mili-Q	25,0 mL

Solução “C”

H ₃ PO ₄ 5% (Merck)	25,0 mL
Água Mili-Q	50,0 mL

Como estoque estas soluções foram armazenadas a 4°C. Para dosagem foi misturada uma parte da solução A, uma parte da solução B, uma parte da solução C e uma parte da água Mili-Q.

4.8.5. Corantes e reagentes:**a) Corante pancrônico de Rosenfeld**

Giemsa-azul-eosina-azul de metileno	97 mg
May-Grunwald-eosina-azul de metileno	53 mg
Metanol (Merck)	100 ml

Após o preparo, o corante foi filtrado e estocado em temperatura ambiente.

b) Solução de Turk

Ácido acético glacial P.A. (Merck)	20,0 ml
Azul de metileno (Merck)	0,5 g
Água bidestilada e deionizada q.s.p.	1,0 l

c) Azul de Tripán

Azul de Tripán (Reagen)	100 mg
PBS q.s.p.	100ml

5. Resultados

5.1. População de estudo

Foram avaliadas 45 pacientes com neoplasia de colo uterino em diferentes estadiamentos da doença, sendo os grupos denominados Não-Invasivo (NIC), Microinvasivo e Invasivo. A idade (média \pm DP) foi de $454,0 \pm 13,9$ anos, com variação de 23 a 71 anos, sendo a média menor no grupo NIC, de $37 \pm 5,0$ anos (31-44), e maior no grupo Invasivo, $53,2 \pm 15,3$ anos (31-68), porém sem diferenças estatisticamente significativas. As características individuais das pacientes quanto à idade, estadiamento e classificação da doença estão apresentados na **Tabela 1**. Os controles foram 36 mulheres voluntárias adultas, com idade (média \pm DP) de $42,4 \pm 10,2$ anos, variação de (26-65 anos), sem doença diagnosticada, que não foram submetidas a tratamento de doenças relacionadas ao colo uterino e que não estiveram em uso de drogas imunossupressoras.

Tabela 1. Identificação das pacientes com neoplasia de colo uterino quanto à idade, estadiamento da doença e conduta terapêutica inicial.

Pacientes	Idade (anos)	Estadiamento	Classificação	Procedimento
P1	64	NIC II/III	NIC	Cirurgia
P2	51	NIC II/III	NIC	Cirurgia
P3	29	NIC III	NIC	Cirurgia
P4	31	NIC III	NIC	Cirurgia
P5	40	NIC III	NIC	Cirurgia
P6	44	NIC III	NIC	Cirurgia
P7	35	NIC III	NIC	Cirurgia
P8	35	NIC III	NIC	Cirurgia
P9	34	NIC III	NIC	Cirurgia
P10	67	NIC III	NIC	Cirurgia
P11	23	NIC III	NIC	Cirurgia
P12	23	NIC III	NIC	Cirurgia
P13	44	NIC III	NIC	Cirurgia
P14	33	NIC III	NIC	Cirurgia
P15	24	NIC III/HPV	NIC	Cirurgia
P16	44	NIC III/HPV	NIC	Cirurgia
P17	26	NIC III/HPV	NIC	Cirurgia
P18	60	Mama + NIC III	NIC	Cirurgia
P19	39	CA IA1	Micro	Cirurgia
P20	52	CA IA1	Micro	Cirurgia
P21	33	CA IA1	Micro	Cirurgia
P22	32	CA IA1	Micro	Cirurgia
P23	58	CA IA1	Micro	Cirurgia
P24	45	CA IIA	Invasivo	Cirurgia
P25	48	CA IIIA	Invasivo	Cirurgia
P26	53	CA IIIA	Invasivo	Cirurgia
P27	48	CA IB1	Invasivo	Cirurgia
P28	33	CA IB2	Invasivo	Cirurgia
P29	43	CA IB2	Invasivo	Cirurgia
P30	71	CA IB2	Invasivo	Cirurgia
P31	67	CA IIB	Invasivo	Quimioterapia
P32	43	CA IIB	Invasivo	Quimioterapia
P33	26	CA IIB	Invasivo	Quimioterapia
P34	31	CA IIB	Invasivo	Cirurgia
P35	52	CA IIB	Invasivo	Quimioterapia
P36	38	CA IIB	Invasivo	Quimioterapia
P37	44	CA IIB	Invasivo	Quimioterapia
P38	59	CA IIB	Invasivo	Cirurgia
P39	40	CA IIB	Invasivo	Quimioterapia
P40	66	CA IIIB	Invasivo	Quimioterapia
P41	62	CA IIIB	Invasivo	Quimioterapia
P42	67	CA IIIB	Invasivo	Quimioterapia
P43	68	CA IIIB	Invasivo	Quimioterapia
P44	53	CA III B	Invasivo	Quimioterapia
P45	45	CA IVB	Invasivo	Quimioterapia

P + número - identificação das pacientes; NIC - neoplasia intraepitelial cervical; CA-carcinoma; IA1, IIA, IIB e IIIB – classificação segundo FIGO (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia).

5.2. Avaliação da função quimiotática de neutrófilos normais incubados com soro de

pacientes e de controles.

Para investigar se pacientes com neoplasia de colo uterino apresentam fator (es) circulante(s) capaz (es) de interferir com a função de leucócitos, neutrófilos normais foram incubados com soro obtido de pacientes com neoplasia de colo uterino.

A **Figura 7** representa a migração de neutrófilos normais após incubação por 30 min com diferentes concentrações (0,5%; 5% e 50%) de soro obtido de pacientes com neoplasia de colo uterino em diferentes estadiamentos, em resposta ao RPMI (migração aleatória) e aos estímulos quimiotáticos fMLP, LTB₄ e IL-8.

No painel (A), grupo NIC, observa-se que houve inibição da migração de neutrófilos após incubação com concentrações crescentes de soro, de forma significativa em resposta ao fMLP e a IL-8, quando as células foram incubadas com soro a 50% comparado a 0,5%.

O painel (B) mostra que após incubação com soro obtido de pacientes do grupo micro-invasivo, neutrófilos normais apresentaram redução da migração frente aos estímulos quimiotáticos. Comparando a migração dos neutrófilos incubados com soro a 0,5%, a concentração de 50% inibiu significativamente a migração das células em resposta aos estímulos fMLP, LTB₄ e IL-8.

No painel (C), as células incubadas com soro de pacientes (50%) com neoplasia de colo uterino em estágio invasivo apresentaram redução da migração, comparado com a menor concentração de soro de (0,5%), de forma significativa ao estímulo quimiotático fMLP.

Considerando que em todos os grupos a inibição foi significativa após incubação com soro a 50%, neutrófilos obtidos de mulheres normais (n=7) foram também incubados com soro heterólogo normal a 50% (grupo controle). O grupo controle respondeu significativamente ao fMLP, LTB₄ e IL-8 comparado à migração aleatória (p=0,013), o que não ocorreu com os neutrófilos tratados com soro (50%) de pacientes nos diferentes

estádios. O soro dessas pacientes, promoveu completa inibição da migração de neutrófilos aos quimioatraentes, comparado ao respectivo estímulo quimiotático do grupo controle ($p < 0,05$) (**Figura 8**).

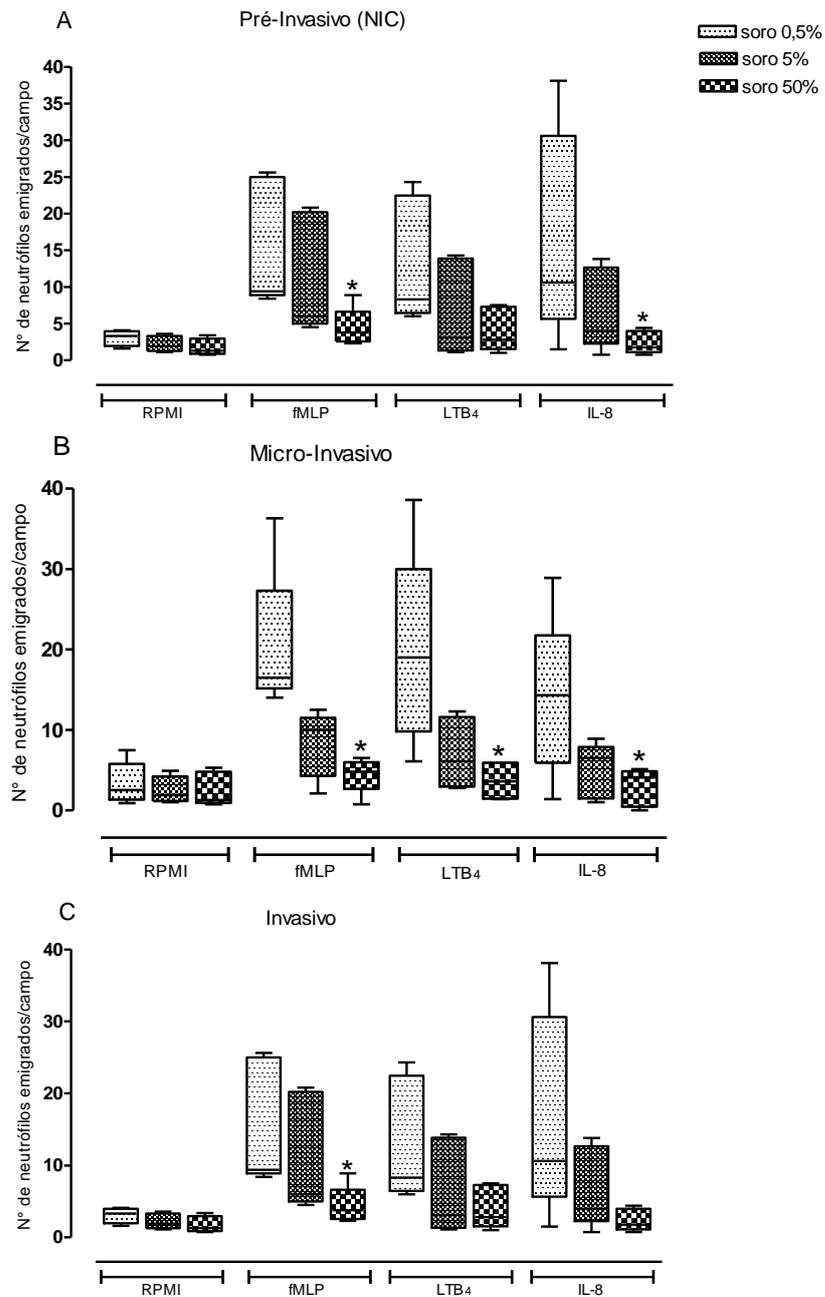


Figura 7. As barras indicam o número de neutrófilos normais emigrados após incubação (30 min) com diferentes concentrações (0,5%; 5% e 50%) de soro obtido de pacientes com neoplasia pré-invasiva (grupo NIC, n=5), micro-invasiva (grupo MICRO, n=5) e invasiva (grupo INV, n=5) do colo uterino em resposta ao RPMI e aos estímulos (10^{-7} M) fMLP, LTB₄ e IL-8. As linhas horizontais representam as medianas, as barras os percentiis 25 e 75% e as barras de erros os percentis 10 e 90%.

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo soro 0,5% (ANOVA ou Kruskal-Wallis seguido de pós teste: Tukey ou Dunn, respectivamente).

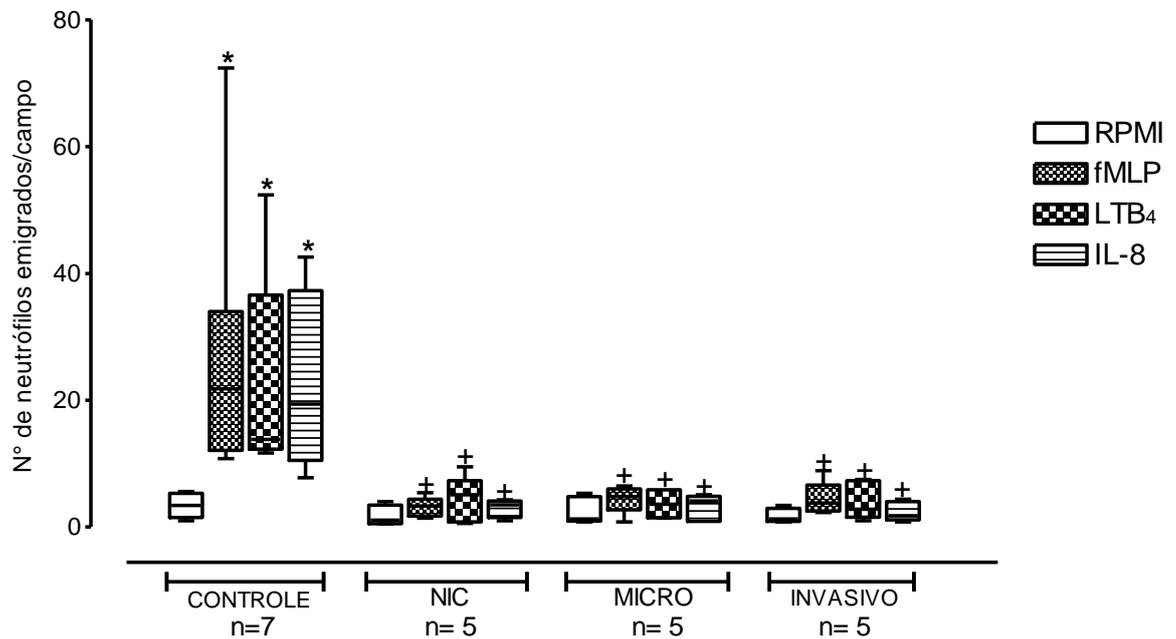


Figura 8. As barras indicam o número de neutrófilos normais emigrados após incubação (30 min) com soro (50%) obtido de voluntárias sadias (Controle, n=7) e de pacientes com neoplasia de colo uterino (n=5 para cada estágio), em resposta ao RPMI (migração aleatória) e aos estímulos quimiotáticos (10^{-7} M) fMLP, LTB₄ e IL-8. As linhas horizontais representam as medianas, as barras os percentiis 25 e 75% e as barras de erros os percentiis 10 e 90%.

* $p < 0,05$ comparado ao RPMI do grupo controle, + $p < 0,05$ comparado ao respectivo estímulo quimiotático do grupo controle (Kruskal-Wallis + Dunn).

5.3. Concentração sérica de citocinas em controles e pacientes com neoplasia de colo uterino em diferentes estadiamentos.

Níveis sistêmicos elevados de citocinas/quimiocinas resultam em efeitos inibitórios sobre a função de leucócitos, incluindo a migração dos neutrófilos, como demonstrado em modelos de sepse (TAVARES-MURTA; CUNHA; FERREIRA, 1998). A quantificação de citocinas foi realizada em amostras de soro do grupo controle (n=13) e do grupo de pacientes com neoplasia de colo uterino (n=45), que foram também avaliadas em grupos quanto ao estadiamento: NIC (n=18), Micro (n=5) e Invasivo (n=22). Foi observado aumento limiar ($p=0,086$) da concentração sérica de TNF- α e aumento significativo de IL-6 ($p<0,001$) e IL-8 ($p<0,05$) no grupo de pacientes, comparado ao grupo controle. Considerando os estadiamentos, houve aumento significativo na concentração sistêmica de IL-6 e IL-8 no grupo Invasivo (n=22) comparado ao grupo controle ($p<0,05$) (**Figura 9**).

5.4. Concentração sérica de metabolitos de NO em controles e pacientes com neoplasia de colo uterino em diferentes estadiamentos.

A Figura 10 apresenta a concentração dos metabolitos de NO em amostras de soro obtidas de 29 mulheres sadias e de 26 pacientes com neoplasia de colo uterino. Houve aumento de NO no grupo de pacientes comparado ao controle, porém não significativo. A significância estatística foi detectada no grupo Micro-Invasivo comparado aos controles ($p<0,05$).

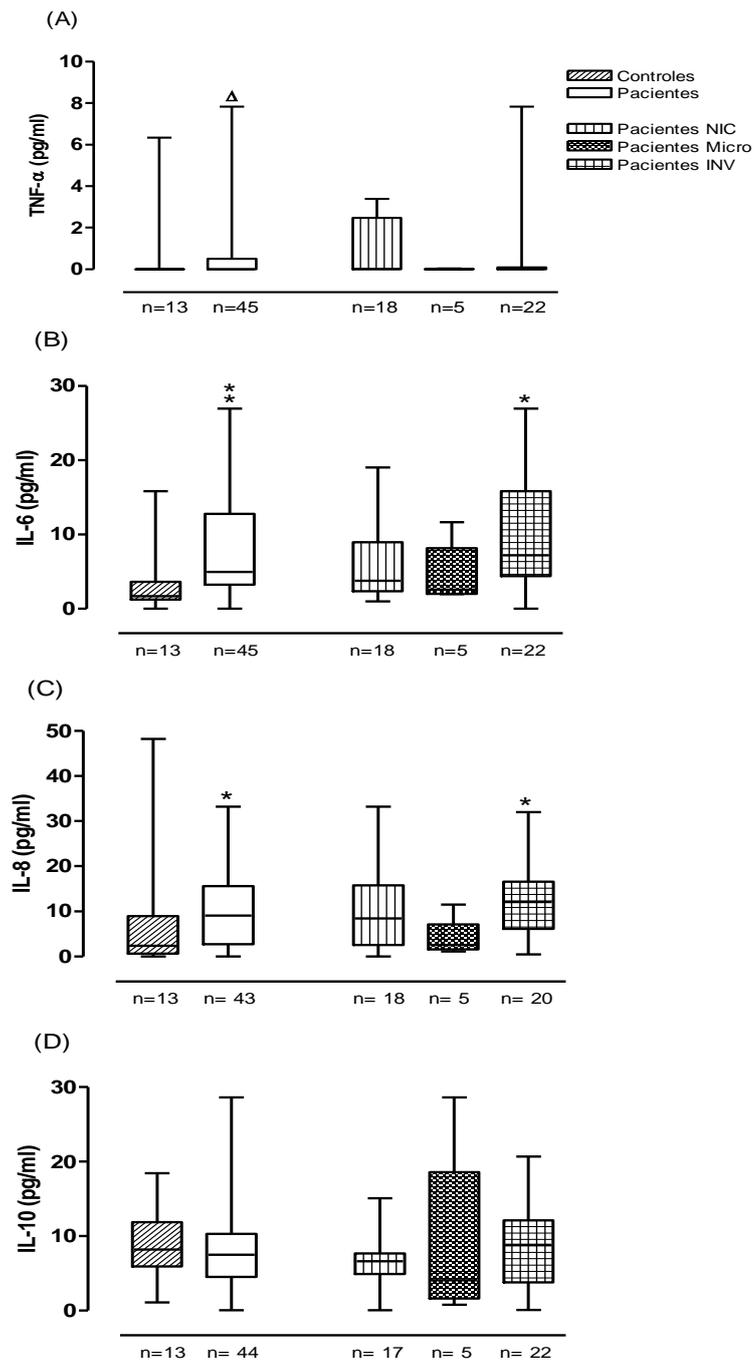


Figura 9. Concentrações de TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 no soro de controles e pacientes com neoplasia de colo uterino. O grupo de pacientes foi também avaliado de acordo com o estadiamento pré-invasivo (NIC), micro-invasivo (MICRO) e invasivo (INV) (grupo de barras à direita). O número de pacientes e controles está indicado abaixo das barras. As linhas horizontais representam as medianas, as barras os percentis 25 e 75 e as linhas verticais os percentis 10 e 90.

Controles e pacientes: $\Delta p=0,086$, $**p<0,001$ $*p<0,05$ (Mann-Whitney).

Controles e estádios: $*p<0,05$ (Kruskal-Wallis + Dunn).

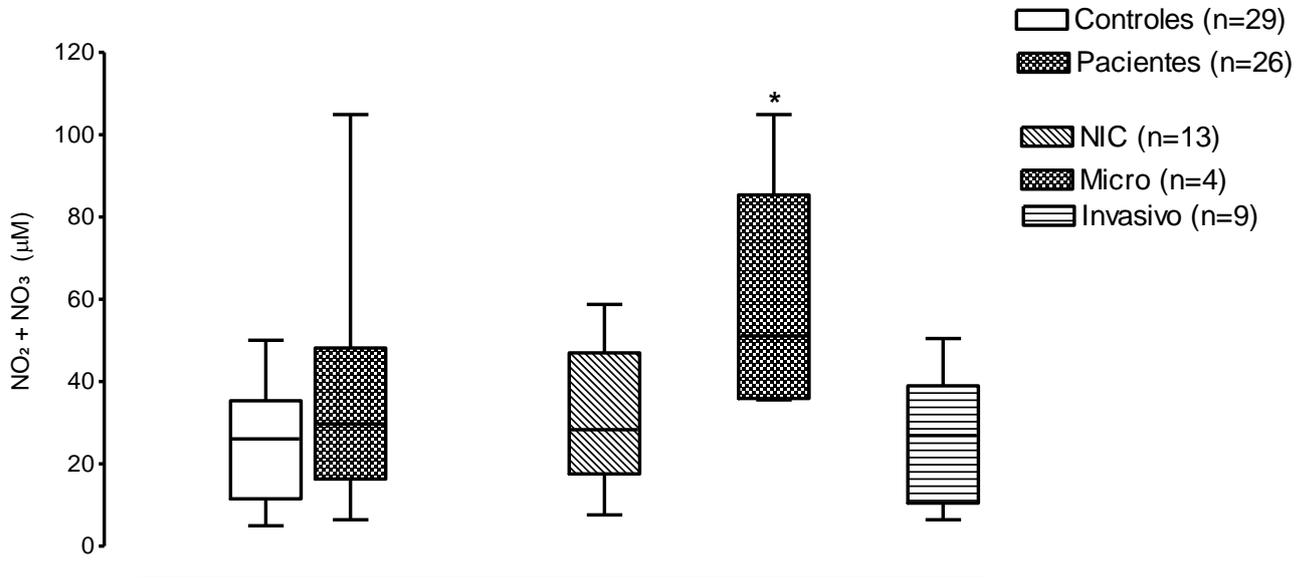


Figura 10. Concentrações de metabólitos de NO (μM de $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$) no soro de controles e pacientes com neoplasia de colo uterino. O grupo de pacientes foi também avaliado de acordo com o estadiamento pré-invasivo (NIC), micro-invasivo (MICRO) e invasivo. O número de controles e pacientes está indicado entre parênteses. As linhas horizontais representam as medianas, as barras os percentis 25 e 75 e as linhas verticais os percentis 10 e 90.

Controles e estádios: $*p < 0,05$ (ANOVA + Tukey).

5.5. Produção de citocinas nos sobrenadantes de neutrófilos de controles e pacientes com neoplasia de colo uterino.

Para avaliar se os leucócitos circulantes estariam envolvidos no aumento da produção sistêmica de citocinas em pacientes com neoplasia de colo uterino, as concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 foram quantificadas nos sobrenadantes obtidos da cultura de neutrófilos (24h) previamente estimulados com LPS. Os neutrófilos foram obtidos de mulheres sadias (n=7, controles) e de pacientes com neoplasia de colo uterino (n=11), sendo estas avaliadas também de acordo com os estadiamentos NIC (n=6) e Invasivo (n=5). Na Figura 11 observa-se aumento (p=0,057) de TNF- α e IL-10 (p<0,05) no grupo das pacientes comparado ao controle, sendo este aumento significativo no grupo Invasivo comparado ao controle, tanto para a produção de TNF- α quanto de IL-10 (p<0,05).

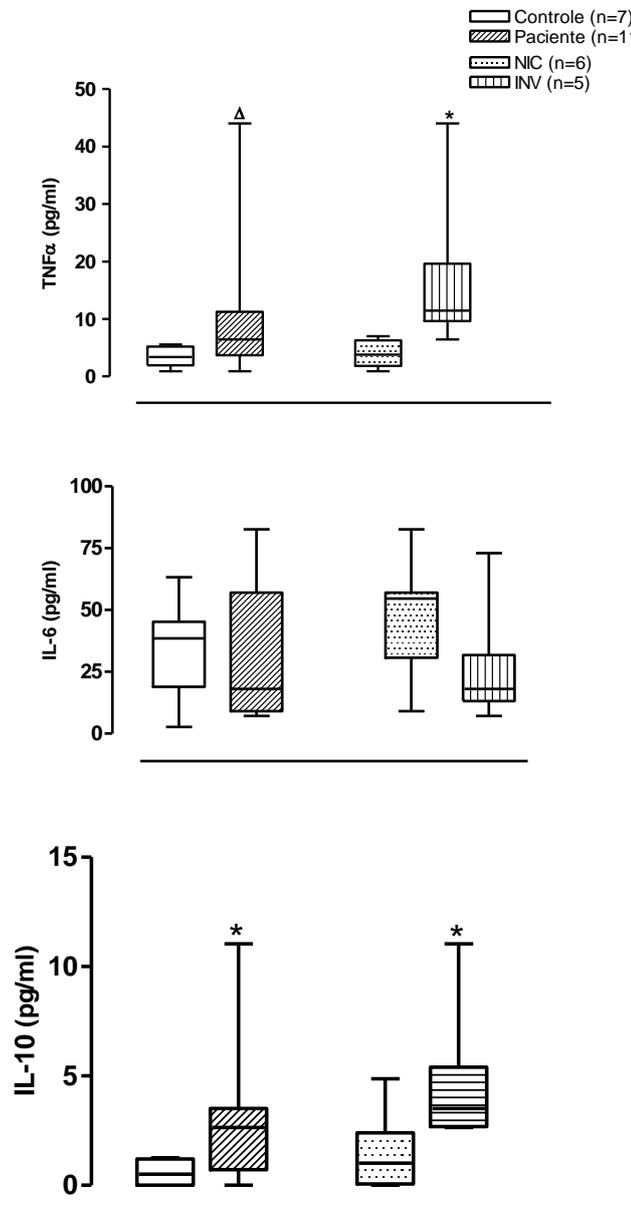


Figura 11. Concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 nos sobrenadantes de neutrófilos estimulados por LPS (1 μ g/ml) após 24 h, obtidos de controles e pacientes com neoplasia de colo uterino. O grupo de pacientes foi também avaliado de acordo com o estadiamento pré-invasivo (NIC) e invasivo (INV). O número de pacientes e controles está indicado entre parênteses. As linhas horizontais representam as medianas, as barras os percentis 25 e 75 e as linhas verticais os percentis 10 e 90.

Controles e pacientes: $\Delta p=0,057$, $*p<0,05$ (Mann-Whitney)

Controles e estádios: $*p<0,05$ (Kruskal-Wallis + Dunn).

5.6. Produção de óxido nítrico nos sobrenadantes de leucócitos de controles e pacientes com neoplasia de colo uterino.

Para avaliar a produção de NO por leucócitos de pacientes com neoplasia de colo uterino, as concentrações de nitrito foram quantificadas nos sobrenadantes obtidos da cultura de neutrófilos (24h) e células mononucleares (48h) previamente estimuladas com LPS. A concentração de nitrito foi avaliada no grupo controle (n=7) e de pacientes (n=11) e de acordo com os estadiamentos NIC (n=6) e Invasivo (n=5). A concentração de nitrito nos sobrenadantes de neutrófilos apresentou-se reduzida, no grupo total das pacientes e nos estadiamento NIC e Invasivo, comparado ao grupo controle, ($p < 0,001$). Considerando a produção de NO por células mononucleares, houve aumento significativo da concentração de nitrito tanto no grupo total quanto nos estadiamento NIC e Invasivo, comparado aos níveis detectados em mulheres controles ($p < 0,05$).

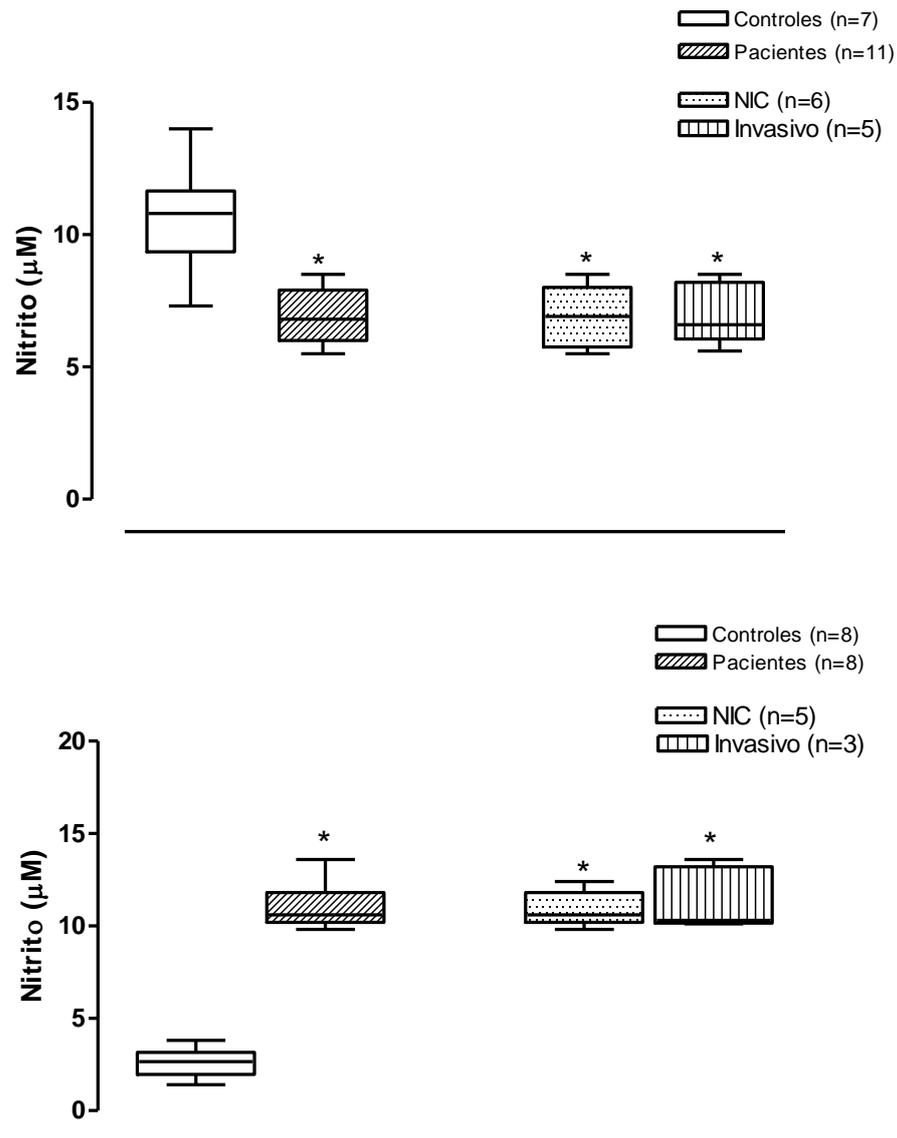


Figura 12. Concentrações de nitrito (μM de NO_2) nos sobrenadantes de neutrófilos (painel superior) e células mononucleares (painel inferior) obtidos de controles e pacientes com neoplasia de colo uterino em diferentes estadiamentos. As células foram estimuladas por LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) durante 24 h (neutrófilos) e 48 h (mononucleares). O grupo de pacientes foi também avaliado de acordo com o estadiamento pré-invasivo (NIC) e invasivo (INV). O número de pacientes e controles está indicado entre parênteses. As linhas horizontais representam as medianas, as barras os percentis 25 e 75 e as linhas verticais os percentis 10 e 90.

Controles e pacientes: * $p < 0,001$ (teste t não pareado).

Controles e estádios: * $p < 0,05$ (ANOVA + Tukey).

5.7. Avaliação da função quimiotática de neutrófilos normais incubados com soro de pacientes após tratamento cirúrgico.

Para avaliar se a retirada das células tumorais poderia restaurar o efeito inibitório do soro sobre a função das células circulantes, neutrófilos normais foram incubados com soro de pacientes do grupo NIC, obtido após tratamento cirúrgico (30 a 60 dias).

Na figura 13, o gráfico superior (pré-tratamento) representa a migração de neutrófilos normais incubados com soro (0,5; 5,0 e 50,0%) de pacientes do grupo NIC, em resposta ao RPMI (migração aleatória) e aos estímulos fMLP, LTB₄ e IL-8. Observa-se que os neutrófilos não respondem de forma significativa aos quimioatraentes, notadamente após incubação com as concentrações de soro de 5% e 50%. Em oposto no gráfico inferior, quando os neutrófilos foram incubados com soro (0,5; 5,0 e 50,0%) de pacientes do grupo NIC após tratamento cirúrgico, é observado aumento significativo do número de neutrófilos emigrados, ao fMLP, LTB₄ e IL-8, comparado ao respectivo RPMI ($p < 0,05$).

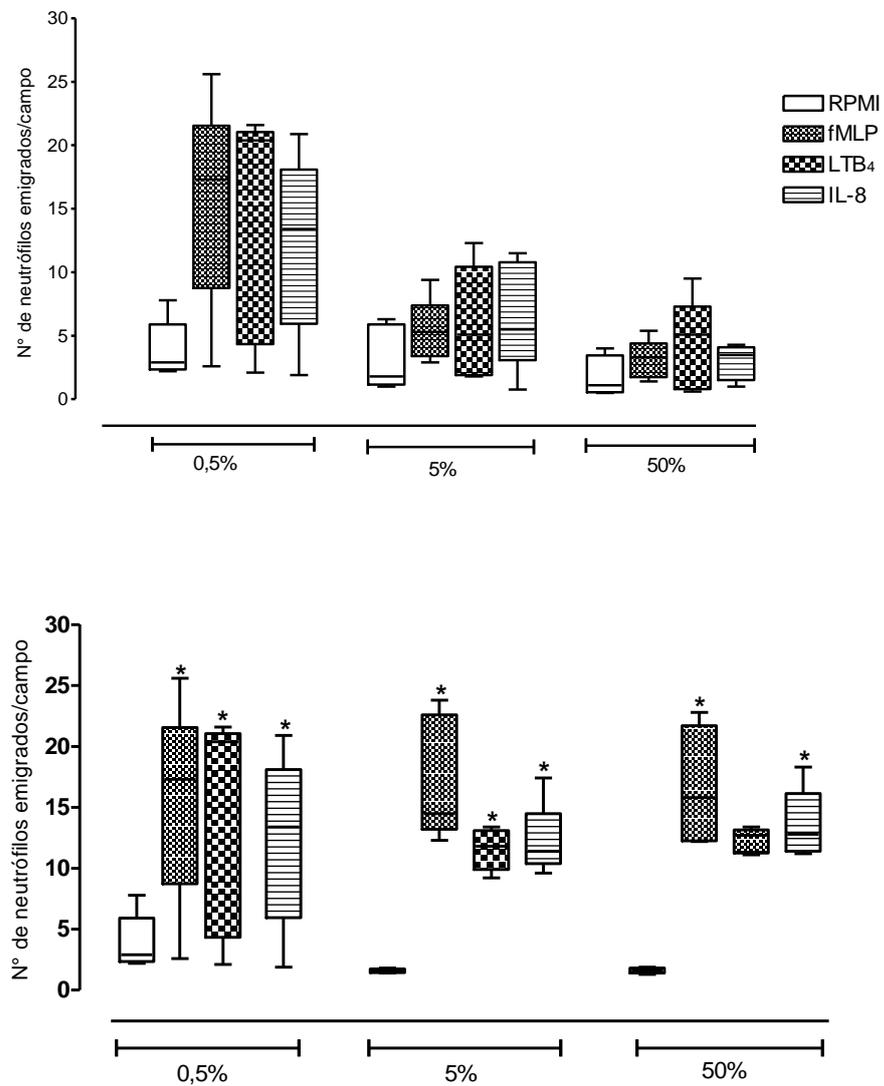


Figura 13. As barras indicam o número de neutrófilos normais emigrados após incubação (30 min) com soro (0,5%; 5% e 50%) obtido de pacientes com neoplasia pré-invasiva do colo uterino (NIC) antes do tratamento (painel superior) e após (30-60 dias) tratamento cirúrgico, em resposta ao RPMI (migração aleatória) e aos estímulos quimiotáticos ($10^{-7}M$) fMLP, LTB₄ e IL-8. As linhas horizontais representam as medianas, as barras os percentiis 25 e 75% e as barras de erros os percentiis 10 e 90%.

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo RPMI (Kruskal-Wallis + Dunn).

5.8. Concentração sérica de citocinas em controles e pacientes com neoplasia de colo uterino antes e após tratamento cirúrgico.

A quantificação das citocinas antes e após tratamento cirúrgico foi realizada em amostras de soro do grupo total de pacientes (n=19), e analisada quanto aos estadiamentos NIC (n=13) e Invasivo (n=6). Na **Figura 14** foi observada redução das concentrações de TNF- α (p=0,052) e IL-6, IL-8 e IL-10 (p<0,05). Avaliando os estadiamentos, houve redução de IL-6 (p<0,05) e IL-8 (limiar p=0,073) no grupo NIC e redução de IL-10 (limiar, p=0,073) no grupo Invasivo, comparando-se os tempos pós-tratamento ao pré-tratamento.

5.9. Concentração sérica de metabólicos de NO em controles e pacientes com neoplasia de colo uterino antes e após tratamento cirúrgico.

A concentração dos metabólicos de NO foi quantificada em amostras de soro obtidas de 26 pacientes (grupo total), divididas em estadiamento NIC (n=13), Micro (n=4) e Invasivo (n=9), comparando-se o período pré-cirúrgico ao pós-cirurgia.

Houve redução significativa nos níveis séricos de NO no grupo total pós-cirurgia comparado ao pré-cirurgia (p<0,05), sendo o mesmo efeito observado no grupo NIC (p<0,05). Nos estadiamentos Micro e Invasivo não foi detectado redução significativa (**Figura15**).

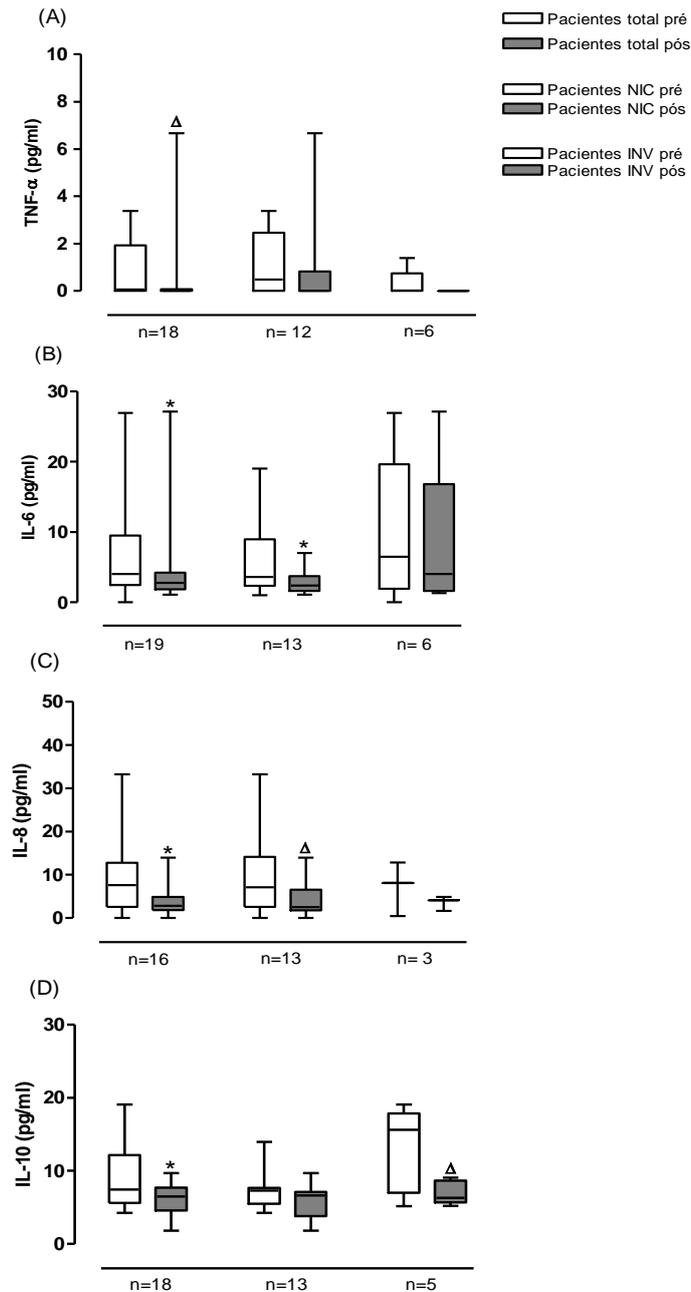


Figura 14. Concentrações de TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 no soro de pacientes com neoplasia de colo uterino antes e após (30 a 60 dias) tratamento cirúrgico. O grupo total de pacientes foi também avaliado de acordo com o estadiamento pré-invasivo (NIC) e invasivo (INV). O número de pacientes e controles está indicado abaixo das barras. As linhas horizontais representam as medianas, as barras os percentis 25 e 75% e as barras de erros os percentis 10 e 90%.

Grupo total: $\Delta p=0,052$; $*p<0,05$ (Wilcoxon e teste t pareado).

Grupo NIC: $\Delta p=0,076$, $*p<0,05$ (teste t pareado).

Grupo INV: $\Delta p=0,073$ (teste t pareado).

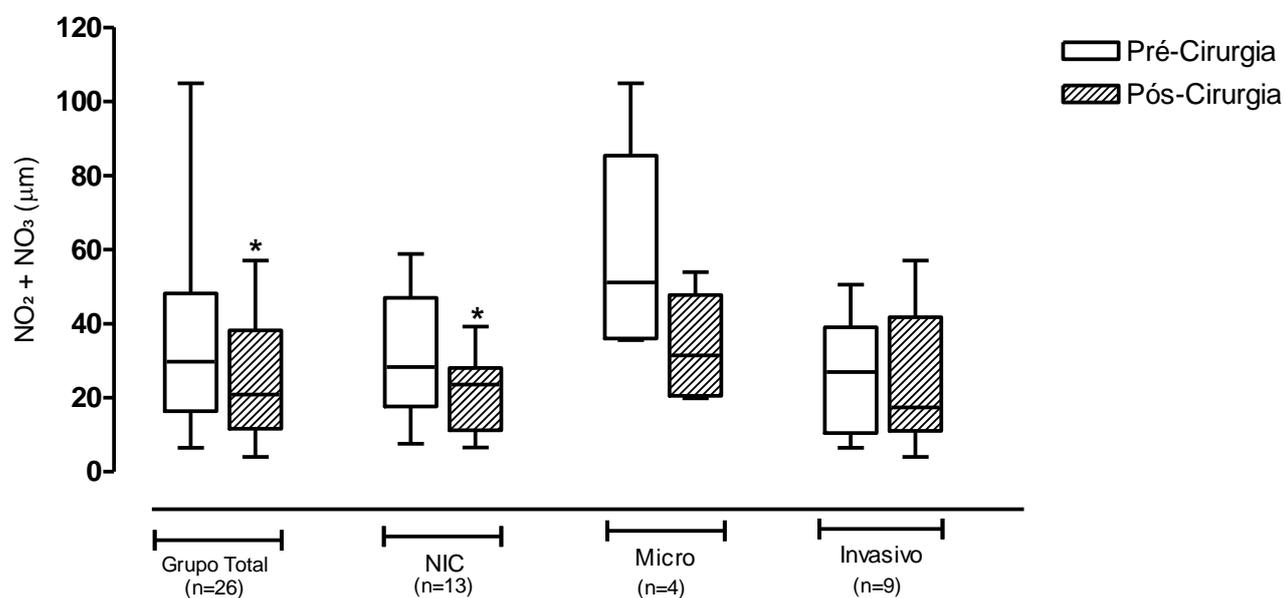


Figura 15. Concentrações de metabólitos de NO (μM de $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$) no soro de pacientes com neoplasia de colo uterino antes e após (30 a 60 dias) tratamento cirúrgico. O grupo total de pacientes foi também avaliado de acordo com o estadiamento pré-invasivo (NIC), micro-invasivo (MICRO) e invasivo. O número de pacientes está indicado entre parênteses. As linhas horizontais representam as medianas, as barras os percentis 25 e 75% e as barras de erros os percentis 10 e 90%.

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo pré-cirurgia (teste t pareado).

5.10. Produção de citocinas e nitrito nos sobrenadantes de leucócitos de pacientes com neoplasia de colo uterino, antes e após tratamento cirúrgico.

Para avaliar o efeito do tratamento sobre a produção de citocinas e NO por leucócitos de pacientes com neoplasia de colo uterino, a concentração desses mediadores foi quantificada nos sobrenadantes obtidos da cultura de neutrófilos (24h) e células mononucleares (48h) previamente estimuladas com LPS.

As concentrações TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 foram avaliadas em pacientes (n=6) antes e após cirurgia, nos estádios Micro e Invasivo. A **figura 16** mostra que não houve diferença significativa na produção dessas citocinas por neutrófilos, entre os tempos pré e após tratamento cirúrgico.

A concentração do nitrito foi avaliada em pacientes (n=6) antes e após cirurgia, nos estádios Micro e Invasivo. Na **Figura 17** mostra que não houve diferença significativa na produção de NO por neutrófilos (A) e células mononucleares (B) entre os tempos pré e após tratamento cirúrgico.

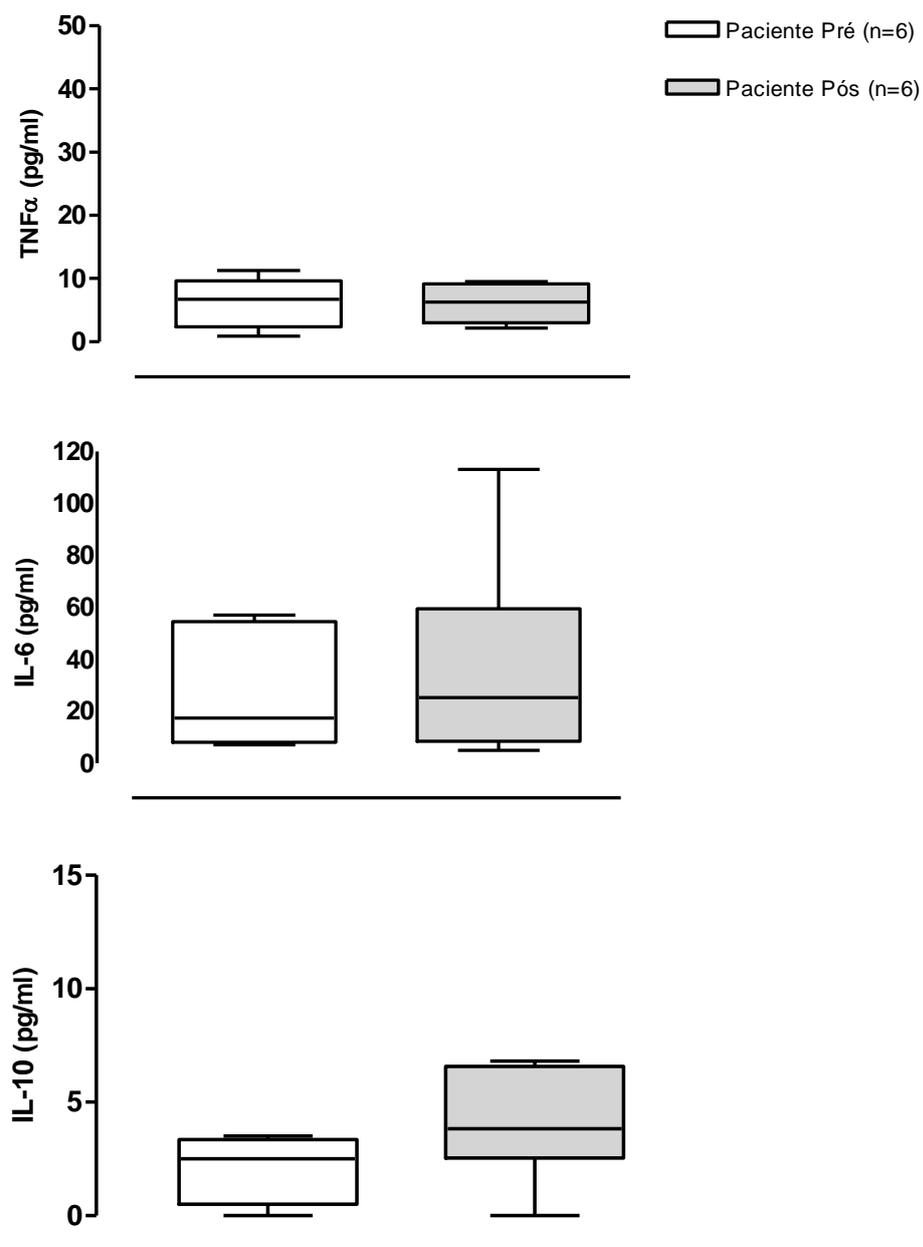


Figura 16. Concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 nos sobrenadantes de neutrófilos, obtidos de pacientes com neoplasia de colo uterino antes e após (30 a 60 dias) tratamento cirúrgico, estimulados por LPS (1 μ g/ml) após 24 h. As linhas horizontais representam as medianas, as barras os percentis 25 e 75 e as linhas verticais os percentis 10 e 90.

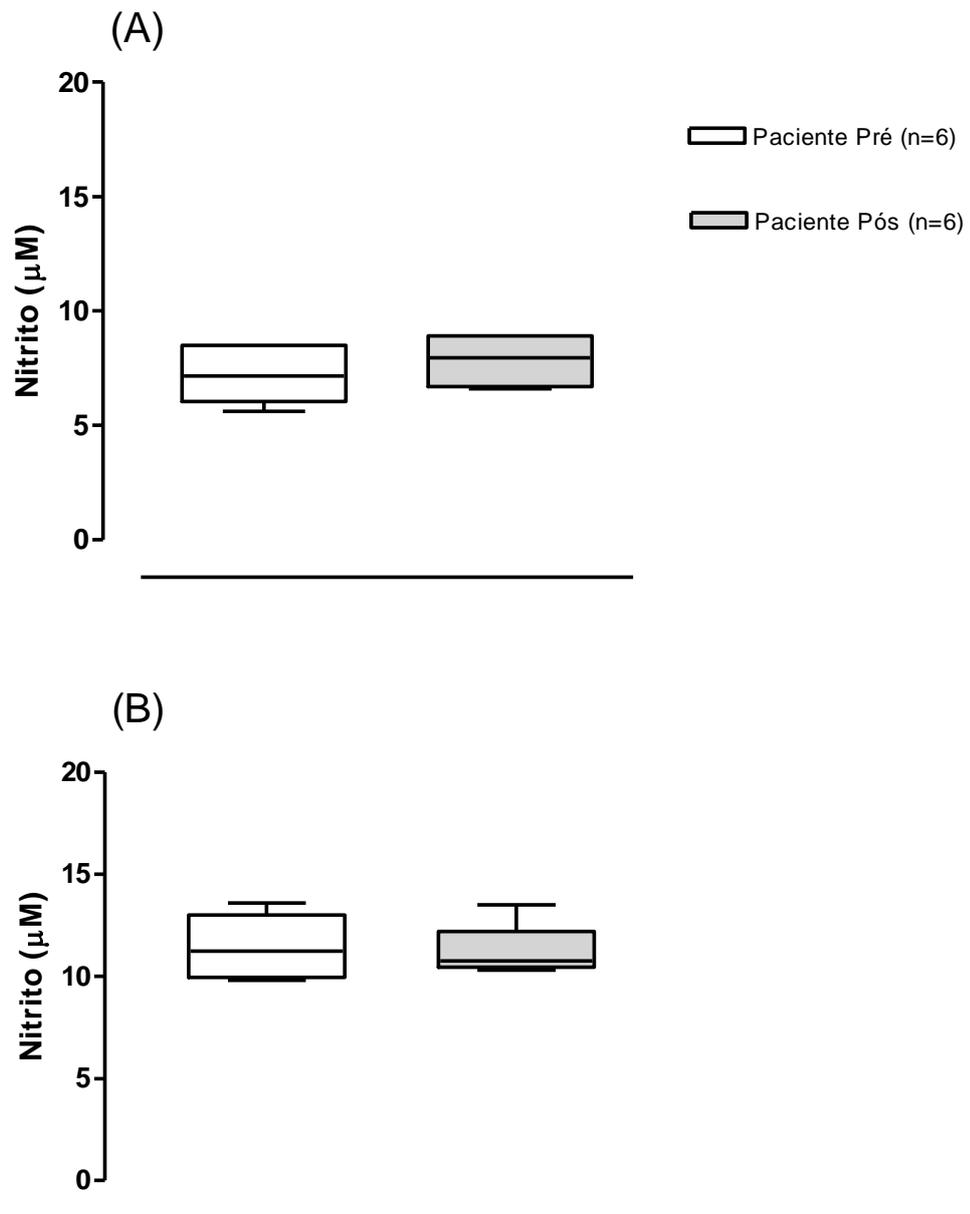


Figura 17. Concentrações de nitrito (μM de NO_2) nos sobrenadantes de neutrófilos (painel A) e células mononucleares (painel B) obtidos de pacientes com neoplasia de colo uterino ($n=6$) antes e após (30 a 60 dias) tratamento cirúrgico. As células foram estimuladas por LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) durante 24 h (neutrófilos) e 48 h (mononucleares). As linhas horizontais representam as medianas, as barras os percentis 25 e 75 e as linhas verticais

6. Discussão

O câncer é uma questão prioritária na saúde mundial, pois os índices de mortalidade demonstram crescimento preocupante a cada ano (MS-INCA, 2009). A incidência do câncer de colo uterino já é evidenciada em mulheres na faixa etária de 20 a 29 anos, e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente entre 45 a 49 anos de idade (MS-INCA, 2009). Em acordo, neste estudo a idade média do grupo total de pacientes foi de 45 anos, sendo a média menor (35 anos) no grupo apresentando estágio pré-invasivo e maior (48 anos) no grupo com diagnóstico em estágio mais avançado. Porém, tem sido observado aumento da incidência de câncer de colo uterino em estádios mais avançados, assim como as lesões precursoras, em pacientes mais jovens (PALO *et al.*, 2002).

O microambiente tumoral é capaz de controlar, por meio da liberação de mediadores específicos, como as quimiocinas, a migração de leucócitos e outras funções desempenhadas por essas células após sua chegada ao sítio tumoral, sendo essencial para o início e a regulação da resposta inflamatória/imune (FINE *et al.*, 2001; BALKWILL *et al.*, 2001). Desta forma, as células inflamatórias e os mediadores produzidos constituem componente chave do microambiente tumoral (MANTOVANI, 2009).

Neste trabalho foram utilizados diferentes quimioatraentes, fMLP, LTB₄ e IL-8, para demonstrar que o efeito inibitório do soro sobre a migração de neutrófilos não foi seletivo para uma única substância quimiotática. O fMLP é identificado como um peptídeo derivado de bactérias, capaz de estimular monócitos e neutrófilos humanos e de outras espécies animais (SUGAWARA *et al.*, 1995). As quimiocinas são uma família de pequenas proteínas, que diferem de fatores quimiotáticos clássicos, como o fMLP, em relação à especificidade que apresentam para determinados tipos de leucócitos (PROOST *et al.*, 1996). A IL-8 é uma quimiocina produzida por vários tipos celulares e reconhecida, particularmente, por sua habilidade em atrair e ativar neutrófilos no sítio inflamatório, promovendo liberação de enzimas e atividade oxidativa. A IL-8 aumenta a expressão de moléculas de adesão, como as

integrinas, na superfície dos neutrófilos, favorecendo a adesão leucócito-endotélio, através de ligação a receptores (CXCR1 e CXCR2) na superfície dessas células (FURIE *et al.*, 1995). Os leucotrienos são mediadores lipídicos resultantes do metabolismo de ácidos graxos poliinsaturados por uma família de enzimas denominadas lipooxigenases. São sintetizados por células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos, após diferentes estímulos como endotoxina e citocinas. Dentre os tipos de LTs, o LTB₄ atua especialmente sobre os neutrófilos, induzindo sua quimiotaxia e ativação (FORD-HUTCHINSON *et al.*, 1984). Neste estudo, os ensaios de migração "*in vitro*" foram realizados com uma única concentração dos estímulos, selecionada por meio da análise da curva concentração-efeito (**Figura 6**).

A maioria dos estudos relacionados aos mecanismos envolvidos na eliminação de células tumorais "*in vivo*" tem-se centralizado, principalmente, nas funções de macrófagos e linfócitos. Porém os neutrófilos também são capazes de exercer atividade anti-tumoral (KIM *et al.*, 2000, DALLEGRI *et al.*, 1991; KOGA *et al.*, 2004). Seu citoplasma possui grânulos que contêm enzimas digestivas e proteínas microbidas denominadas defensinas, estas com alto potencial tóxico contra vários tipos de células tumorais. As membranas plasmáticas podem expressar diversos receptores e outras estruturas necessárias para o reconhecimento e eliminação de microorganismos. Seus alvos constituem as bactérias, fungos, protozoários, vírus e células tumorais (KOGA *et al.*, 2004).

Recentemente demonstramos que neutrófilos circulantes obtidos de pacientes com neoplasia de colo uterino apresentam redução da capacidade de migração comparada a mulheres normais. Considerando o estágio do tumor, pacientes com câncer invasivo apresentaram maior redução comparada ao grupo em estádios pré-invasivo ou microinvasivo. Além disso, neste último grupo (pré-/microinvasivo), a retirada cirúrgica do tumor aumentou a migração dos neutrófilos, comparado ao ensaio realizado no momento do diagnóstico,

sugerindo que as células tumorais poderiam induzir à produção de mediadores circulantes, responsáveis pela inibição da migração de neutrófilos (FERNANDES Jr *et al.*, 2007).

A partir destes resultados surgiu a hipótese de que pacientes com neoplasia de colo uterino, inclusive em estadiamentos iniciais, poderiam produzir fatores circulantes capazes de inibir a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório.

Para testar esta hipótese, no presente estudo o primeiro objetivo foi avaliar o efeito do soro obtido de pacientes com neoplasia de colo uterino em diferentes estadiamentos sobre a capacidade de migração de neutrófilos normais. Em todos os grupos avaliados foi observada redução da migração dos neutrófilos frente aos diferentes estímulos quimiotáticos, de forma concentração-dependente, atingindo a máxima inibição após incubação com soro a 50%, comparado à menor concentração (**Figura 7**). Mais importante, a incubação de neutrófilos normais com soro heterólogo normal a 50% não alterou a migração dessas células, embora a mesma concentração do soro obtido de pacientes com neoplasia de colo uterino, nos diferentes estadiamentos, tenha sido capaz de promover inibição completa da migração de neutrófilos obtidos das mesmas mulheres do grupo controle (**Figura 8**). Esses resultados demonstram a presença de mediadores inibitórios circulantes em pacientes com neoplasia de colo uterino, independente do estadiamento, provavelmente induzidos pela presença de células tumorais.

A existência de fatores inibitórios da migração de neutrófilos para um sítio inflamatório é descrita em doenças. Na AIDS, a presença de um fator sérico termo lábil foi apontada como responsável pelo efeito inibitório sobre a motilidade dos neutrófilos circulantes nesses pacientes, variável de acordo com o estágio da doença (ELLIS *et al.*, 1998). No diabetes experimental é verificada a redução do rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio frente ao estímulo inflamatório, mediado por substâncias circulantes (CRUZ *et al.*, 2000). Na sepse humana, a redução da capacidade de migração dos neutrófilos está associada

ao pior prognóstico (TAVARES-MURTA *et al.*, 2002). Em recém-nascidos com sepse (EISENFELD *et al.*, 1992) e também em pacientes queimados que desenvolvem infecção (PICCOLO *et al.*, 1995), a redução da migração de neutrófilos é mediada por fatores séricos, pois a transfusão sanguínea foi capaz de restabelecer a função dos neutrófilos.

Em pacientes com câncer de cabeça e pescoço foi observada redução da migração de monócitos, cujo mecanismo envolve, pelo menos parcialmente, a presença de fatores solúveis produzidos pelo próprio tumor, pois o soro obtido dos pacientes promoveu efeito imunossupressor sobre funções de monócitos normais (LANG *et al.*, 2003). No câncer de mama é relatada redução da migração de neutrófilos em pacientes submetidas a tratamento quimioterápico e que apresentaram episódios de infecção entre os ciclos. O soro dessas pacientes reduziu a migração de neutrófilos normais, também sugerindo a presença de mediadores inibitórios circulantes (MENDONÇA *et al.*, 2006). Os resultados do presente estudo estão em acordo com esses dados de literatura.

O passo seguinte foi identificar possíveis mediadores circulantes envolvidos no efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos. Trabalhos de literatura demonstram a participação de diversos mediadores na modulação do recrutamento de neutrófilos. Citocinas e quimiocinas como TNF- α e IL-8, quando presentes nos tecidos, medeiam a defesa local do organismo através de indução da migração e ativação de neutrófilos (CUNHA; FERREIRA *et al.*, 1986; RIBEIRO *et al.*, 1997), sendo que o aumento da expressão de IL-8 ou de seus receptores em células malignas sugere importante papel regulador para essa quimiocina no microambiente tumoral (WAUGH *et al.*, 2008). Por outro lado, altas concentrações circulantes de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (GOGOS *et al.*, 2000), citocina antiinflamatória IL-10 (VAN DER POLL *et al.*, 1997) e metabólitos de NO podem reduzir a migração de neutrófilos para o sitio inflamatório, como demonstrado em modelos de endotoxemia e sepse (OTSUKA *et al.*, 1990; TAVARESMURTA; CUNHA;

FERREIRA, 1998). Em pacientes com câncer foi observado aumento das concentrações sistêmicas de TNF- α e IL-8, comparado a mulheres normais (COPE *et al.*, 1995; JABLONSKA, 1998; COSKUN *et al.*, 2003). Assim, foram quantificadas as concentrações de citocinas e metabólitos de NO, em soro de controles e pacientes com neoplasia de colo uterino em diferentes estadiamentos. Ainda, para identificar a produção desses mediadores por leucócitos circulantes, foi também quantificada a concentração de citocinas e NO nos sobrenadantes de cultura de neutrófilos e células mononucleares de controles e pacientes.

Os resultados demonstraram aumento significativo nas concentrações de IL-6 e IL-8, e no limiar de significância para TNF- α , no soro do grupo total de pacientes comparado ao controle. Ainda, quando avaliado o estadiamento, aumento significativo nas concentrações de IL-6 e IL-8 foi observado apenas no grupo Invasivo (**Figura 9**). Já no sobrenadante da cultura de neutrófilos houve aumento significativo dos níveis de IL-10 e no limiar de significância para TNF- α , no grupo total de pacientes comparado ao controle, sendo que apenas no grupo Invasivo foi observada produção significativa de TNF- α e IL-10 (**Figura 11**).

Em acordo com nossos resultados, estudos em pacientes com câncer de mama (LYON *et al.*, 2008) ou de ovário (GORELIK *et al.*, 2005) demonstram aumento significativo das concentrações de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α comparado aos controles. Estudos ainda mais recentes em câncer de ovário demonstram aumento de IL-6 no soro de pacientes com doença em estágio avançado comparado ao inicial (LUTGENDORF *et al.*, 2008), e aumento de IL-10 correlacionado com o grau de diferenciação do tumor (MUSTEA *et al.*, 2009). Níveis mais elevados de IL-10 foram detectados nos tumores pouco diferenciados (MUSTEA *et al.*, 2009). Porém, outros trabalhos realizados em mulheres com câncer de mama não apresentaram diferença significativa em relação às concentrações circulantes de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α comparado ao grupo de voluntárias sadias (PUSZTAI *et al.*, 2004). Essas diferenças poderiam ser resultantes da limitação de métodos utilizados para detecção de

citocinas (LYON *et al.*, 2008). Outra possível explicação para as diferenças de resultados descritos em literatura, em relação às concentrações sistêmicas de citocinas, poderia ser decorrente do estadiamento do tumor. Já foi sugerido que o aumento de funções leucocitárias, incluindo a produção de citocinas, poderia ser resultado da ativação do sistema imune celular em resposta à célula tumoral, em fases iniciais (SUSS *et al.*, 1984), enquanto que a redução nessas funções seria, principalmente, consequência da progressão da doença (GEBHARD *et al.*, 2000).

Outro possível mediador envolvido no efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos é o NO, sendo este um inibidor endógeno da adesão de neutrófilos ao endotélio e de sua posterior migração (HICKEY *et al.*, 1997). O pré-tratamento de animais com um inibidor da síntese de NO foi capaz de prevenir o efeito inibitório de TNF- α e IL-8 sobre a migração de neutrófilos, sugerindo que essas citocinas poderiam atuar via produção de NO. Em camundongos deficientes em iNOS também se observa aumento da adesão dos neutrófilos ao endotélio (HICKEY *et al.*, 1997). A aminoguanidina, um inibidor da iNOS, preveniu a inibição da migração de neutrófilos em modelos de sepse (BENJAMIM *et al.*, 2000) e endotoxemia (TAVARES-MURTA *et al.*, 2001), reforçando a participação do NO como mediador da inibição da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório em doenças.

O NO é molécula-chave sinalizadora que regula a tumorigênese (JAISWAL *et al.*, 2001). A expressão da enzima NOS foi demonstrada em tecidos malignos de tumores ginecológicos, de mama, sistema nervoso central, gástrico e colorretais, tendo um importante papel na progressão do câncer (THOMSEN *et al.*, 1995; COBBS *et al.*, 1995; JAISWAL *et al.*, 2001; CIANCHI *et al.*, 2003; CIANCHI *et al.*, 2004; ICHINOE *et al.*, 2004).

Assim, foi quantificada a produção sistêmica de NO em amostras de soro obtido de controles e pacientes com neoplasia de colo uterino e em cultura de neutrófilos e células mononucleares desses mesmos grupos. Não foi observado aumento estatisticamente

significativo de metabólitos de NO no soro do grupo total de pacientes comparado ao controle. Porém, a análise por estadiamentos demonstrou aumento significativo para o grupo Microinvasivo. Nos sobrenadantes da cultura de leucócitos houve produção diferencial de NO, isto é, em neutrófilos foi observada redução significativa nas concentrações de nitrito no grupo total de pacientes e nos estadiamentos NIC e Invasivo, enquanto que na cultura de células mononucleares houve aumento das concentrações de NO tanto no grupo total de pacientes quanto nos estadiamentos NIC e Invasivo. Esta produção diferencial pelos leucócitos poderia justificar a ausência de concentração elevada de NO na circulação.

Outros estudos detectaram concentrações plasmáticas elevadas de metabólitos de NO em pacientes com câncer de colo uterino invasivo (BEEVI et al., 2007), assim como também foi relatado aumento da produção de NO por leucócitos circulantes de pacientes com câncer gástrico (DINCER et al., 2006), comparado a grupos controle, e acompanhado de reduzida atividade antioxidante dessas células (BEEVI et al., 2007; DINCER et al., 2006).

Com os resultados obtidos até então, foi possível concluir que pacientes com neoplasia de colo uterino produzem através de leucócitos circulantes e/ou células tumorais, mediadores como citocinas e NO, capazes de inibir a migração e outras funções de neutrófilos. A produção de citocinas ocorre nos estadiamentos invasivos, enquanto que o NO já é produzido a partir de estádios mais iniciais. Para reforçar esses achados, foi investigado se a retirada do tumor seria capaz de reverter os efeitos observados sobre a migração de neutrófilos (inibição) e produção de mediadores (aumento). Para isto, pacientes com neoplasia de colo uterino foram avaliadas também após tratamento cirúrgico para retirada do tumor, e os resultados foram comparados com aqueles obtidos no pré-tratamento. Para o ensaio de migração celular foi avaliado apenas o grupo NIC, de maior interesse no momento, visto que é considerada neoplasia pré-invasiva, onde as alterações seriam limitadas ao epitélio.

Os resultados demonstraram que neutrófilos normais incubados com soro de pacientes após cirurgia apresentaram capacidade de migração preservada em resposta aos diversos quimioatraentes, comparado à migração aleatória. Desta forma, se comparado ao mesmo procedimento realizado com soro antes do tratamento, pode-se concluir que houve efetiva recuperação na capacidade de migração dos neutrófilos (**Figura 13**). Esses resultados reforçam achados anteriores em pacientes com neoplasia de colo uterino em estádios iniciais, em que a retirada cirúrgica do tumor aumentou a migração de neutrófilos, sugerindo que as células tumorais poderiam induzir à produção de mediadores circulantes, responsáveis pela inibição da migração de neutrófilos (FERNANDES Jr *et al.*, 2007).

Em relação à produção de citocinas no soro de pacientes após tratamento foi observada redução significativa nas concentrações de IL-6, IL-8 e IL-10, e no limiar de significância para TNF- α , comparado ao pré-tratamento. Quanto aos estadiamentos, no grupo NIC houve redução significativa para IL-6 e no limiar de significância para IL-8, sendo que, no grupo Invasivo, foi observada redução de IL-10, embora no limiar de significância, comparado ao tempo pré-tratamento (**Figura 14**). Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de citocinas no sobrenadante da cultura de neutrófilos entre os tempos pré e pós-tratamento (**Figura 16**). Em acordo com nossos resultados, em pacientes com câncer de ovário avançado houve redução significativa nas concentrações de IL-10 já 8 dias após cirurgia (MUSTEA *et al.*, 2009).

Em relação à produção de NO, os níveis séricos de nitrato e nitrito apresentaram-se diminuídos após cirurgia comparado ao tempo pré cirurgia, sendo o mesmo efeito observado no grupo NIC (**Figura 15**). Assim como observado para citocinas, no sobrenadante da cultura de neutrófilos ou células mononucleares não foi observada diferença significativa entre os tempos pré e pós-tratamento (**Figura 17**). Em pacientes com neoplasia de colo uterino submetidas à quimioterapia neo-adjuvante, foi observada redução de citocinas TH1 e aumento

significativo de citocinas TH2 no período pré- tratamento, sendo que após quimioterapia foi observado aumento de citocinas IL-2 e INF- γ e redução de IL-4 e IL-10, sugerindo que as concentrações de citocinas poderiam estar relacionadas com a resposta terapêutica na neoplasia avançada de colo uterino (SHARMA *et al.*, 2009).

Em conjunto, os resultados confirmam a hipótese de que pacientes com neoplasia de colo uterino, mesmo em estágio pré-invasivo, produzem mediadores circulantes como IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e NO, capazes de inibir a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório. Esses mediadores podem ser produzidos por leucócitos circulantes, conforme demonstrado, bem como pelas células tumorais, visto que a retirada do tumor reverte os efeitos observados.

Outros possíveis mediadores também poderiam estar envolvidos no efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos circulantes. Por exemplo, o fator transformador do crescimento (TGF)- β é uma citocina antiinflamatória capaz de levar a uma regulação decrescente da atividade de leucócitos (DEMIRKAZIK *et al.*, 2002). Plasma obtido de pacientes que receberam transfusão sanguínea inibiu a migração de neutrófilos normais, sendo este efeito associado ao aumento de TGF- β nas amostras avaliadas (GHIO *et al.*, 2003). Outro mediador envolvido poderia ser a α -1 glicoproteína ácida (AGP). Recentemente foi demonstrado que a proteína de fase aguda AGP, isolada do soro de pacientes sépticos, inibiu a migração de neutrófilos induzida por carragenina para a cavidade peritoneal de ratos. Além disso, a incubação de AGP com neutrófilos normais inibiu a quimiotaxia dessas células e este efeito foi associado ao aumento da produção de NO (MESTRINER *et al.*, 2007). As proteínas de fase aguda encontram-se em concentrações elevadas em pacientes com câncer, e podem ser úteis como fator prognóstico no risco de recidiva. Níveis elevados de AGP e HP (haptoglobina) no pré-operatório em pacientes com neoplasia de pulmão estão relacionados a uma baixa sobrevida após tratamento (KASPRZYK M. *et al.*, 2008).

É proposto que, em termos de resposta inflamatória, as neoplasias constituem um paradoxo. Os tumores produzem citocinas e quimiocinas que recrutam leucócitos. Entretanto, existe uma deficiência em promover resposta inflamatória em outros sítios que não o tumoral. O mais provável é que as quimiocinas produzidas pelo próprio tumor, quando presentes na circulação, possam dessensibilizar os leucócitos ou, ainda, o tumor pode produzir mediadores antiinflamatórios. Assim, uma capacidade defeituosa em promover uma resposta inflamatória para outro local poderia coexistir com o contínuo recrutamento de leucócitos para o sítio tumoral (BALKWILL et al., 2001).

A melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação da função das células circulantes pode ser essencial na conduta terapêutica capaz de restabelecer uma resposta inflamatória/imune eficaz contra agentes infecciosos e contra as próprias células tumorais.

7. Conclusão

Pacientes com neoplasia de colo uterino, a partir de estágio pré-invasivo, apresentam mediadores circulantes capazes de inibir a migração de neutrófilos induzida por diferentes estímulos quimiotáticos, indicando um comprometimento da resposta imune/inflamatória em fases iniciais da doença.

8. Referências Bibliográficas

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. Cap. 17.pp. 354. 368, 1995.

ALEIXO NETO, A. Aspectos epidemiológicos do câncer cervical. **Revista de Saúde Pública**. v. 25, n.4, p. 326-333, 1991.

ALLEN, L. A. & ADEREM, A. Mechanisms of phagocytosis. **Current Opinion Immunology**, v. 8, n.1, p. 36-40, 1996.

BALKWILL, F. & MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, p. 539-545, 2001.

BAUER, S.; GROH, V.; WU, J.; STEINLE, A.; PHILLIPS, J.H.; LANIER, L.L.; SPIES, T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stressinducible MICA. **Science**, Washington, v. 285, p. 727-729, 1999.

BEEVI, S. S.; RASHEED, M.H.; GEETHA, A. Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous carcinoma. **Clin Chim Acta**, v. 375:119-23, 2007.

BENEDET, J. L.; BENDER, H.; JONES III, H. et al. Staging classifications and clinical practice guidelines of gynaecologic cancers. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 70, p. 207-312, 2000.

BENJAMIM CF, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Role of Nitric Oxide in the Failure of Neutrophil Migration in Sepsis. **Jurnal Infect. Dis.**, 182: 214-223, 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2009: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, INCA; 2009. 94p. il. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2009/versaofinal.pdf>>. Acesso em 31/01/2009.

BRODERS, A.C. Carcinoma in situ contrasted with benign penetrating epithelium. **Jour. Am. Med. Assoc.**, v.99, p.1670-1932, 1932.

CIANCHI F.; CORTESINI C.; FANTAPPIE O.; MESSERINI L.; SARDI I.; LASAGNA N.; PERNA F.; FABBRONI V.; DI FELICE A.; PERIGLE G.; MAZZANTI R.; MASINI E.; E. Cyclooxygenase-2 activatio medianes the proangiogenic effect of nitric oxide incolorectal cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 10, n. 8, p. 2694-704, Apr. 2004

CIANCHI F.; CORTESINI C.; FANTAPPIE O.; MESSERINI L.; SCHIAVONE N.; VANNACCI A.; NISTRI S.; SARDI I.; BARONI G.; MARZOCCA C.; PERNA F.; MAZZANTI R.; BECHI P.; MASINI E.; Inducible nitric oxide sythase expression in human colorectal cancer: correlation with tumor angiogenesis. **Am J. Pathol.** v. 162, n. 3, p. 793-801, Mar. 2003.

COPE, A. P.; ADERKA, D.; WALLACH, D.; KAHAN, M.; CHU N. R.; BRENNAN, F. M.; FELDMANN, M. D. Soluble TNF receptor production by activated T lymphocytes: differential effects of acute and chronic exposure to TNF. **Immunology** v.84:21-30, 1995.

COSKUN, U.; GUNEL, N.; ONUK, E.; YILMAZ, E.; BAYRAM, O.; YAMAC, D. CIHAN, A. UCAN, B. YILDIRIM, Y.; CELENKOGLU, G. OZKAN, S. Effect of different neoadjuvant chemotherapy regimens on locally advanced breast cancer. **Neoplasma** 50:210-6, 2003.

COUSSENS, L., M. & WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 860-867, Dec. 2002.

CRUZ, J. W. M. C.; OLIVEIRA, M. A.; HOHMAN, T. C.; FORTES, Z. B. Influence of tolrestat on the defective leukocyte-endothelial interaction in experimental diabetes. *Eur J Pharmacol.* v. 391, p. 163-174, 2000.

CUNHA, F. Q.; SOUZA, G. E.; FERREIRA, S. H. Macrophages simulated with lipopolysaccharide release a selective neutrophil chemotactic factor: an in vivo demonstration. **Brazilian Journal of Medical & Biological Reserch.** v. 19, p. 775-777, 1986.

COBBS C.S.; BRENNAN J.E.; ALDAPE K.D.; BRETT B.S.; ISRAEL M.A.; Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. *Cancer res. Chicago*, v. 55, n. 4, p. 527-30, Feb. 1995.

DALLEGRI, F.; OTTONELLO L.; BALLESTRERO. A., *et al.* Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1. **Inflammation.**; 15:15-30, 1991.

DEJANA, E.; CORADA, M. & LAMPUGNANI, M. G. Endothelial cell-to-cell junctions. **FASEB Journal**, v. 9, p. 910-918, 1995.

DEMIRKAZIK, A. *et al.* Effect of prior therapy and bone marrow metastases on progenitor cell content of blood stem cell harvests in breast cancer patients. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 8, p. 268-272, 2002.

DINCER, Y.; AKCAY, T.; TORTUM, O. B.; DOGUSOY, G. Nitric oxide and antioxidant defense in patients with gastric cancer. **Dig Dis Sci**, v. 51:1367-70, 2006.

DITTMAR, T. *et al.* Lessons from tumor and immunocompetent cells. The quantitative engagement of ligand-receptor interactions modulates stop-and-go behaviour as well as proliferation. **Medicina**, v. 60, supl. II, p. 27-33, 2000

DONG, Y.; ABDULLAH, K.; YAN, T. Z. *et al.* Effect of thermal injury and sepsis on neutrophil function. **Journal of Trauma**, v. 34, n. 3, p. 417-421, 1993.

DUIGNAN, J. P., *et al.* The association of impaired neutrophil chemotaxis with postoperative surgical sepsis. **British Journal of Surgery**, v 73, P. 238-240, 1986.

EISENFELD, L.; KRAUSE, P. J.; HERSON, V. C. *et al.* Enhancement of neonatal neutrophil motility (chemotaxis) with adult fresh frozen plasma. **American Journal of Perinatology**, v. 9, n. 1, p. 5-8, 1992.

ELBIM, C.; PREVOT, M. H.; BOUSCARAT, F. et al. Impairment of polymorphonuclear neutrophil function in HIV-infected patients. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 25, suppl.2, p. 66-70, 1995.

ELLIS, M.; GUPTA, S.; GALANT, S.; HAKIM, S.; VANDEVEN, C.; TOY, C.; CAIRO, M. S. Impaired neutrophil function in patients with AIDS or AIDS-related complex: a comprehensive evaluation. *J. Infect. Dis.* V. 158, p. 1268-1276, 1998.

ELUF-NETO, J., *et al.* Human papilloma virus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br. Journal of Cancer* 69: 114-119, 1994

EVANS, M. F.; ADAMSON, C.; PAPILO, J. L.; JOHN, T. L.; LEIMAN, G.; COOPER, K. Distribution of human papillomavirus types in thin Prep Papanicolaou Tests Classified According to the Bethesda 2001 Terminology and correlations with Patient Age and Biopsy outcomes. **Cancer**, v. 106, n. 5, p. 1054-1064, 2006.

FERNANDES JÚNIOR P.C., GARCIA C.B., MICHELI D.C., CUNHA F.Q., MURTA E.F.C., TAVARES-MURTA B.M.; **Circulating neutrophils may play a role in the host response in cervical cancer.** *International Journal Gynecol Cancer Marc* 26, 2007.

FINE, J. S.; BYRNES, H. D.; ZAVODNY, P. J. et al. Evaluation of signal transduction pathways in chemoattractant-induced human monocyte chemotaxis. **Inflammation**, v. 25, n. 2, p. 61-67, 2001.

FRANK, N.C.; WHITE, K.; EZEKOWITZ, R.A. Phagocytosis and Development: Back to the future. *Current Opinion in Immunology*, v. 11, p. 47-52, 1999.

FORD-HUTCHINSON, A. W. *et al.* Leukotriene B4, polymorphonuclear leukocytes and inflammatory exudates in the rat. *Prostaglandis*, v. 28, p. 13-27, 1984.

FURIE, M.B. & RANDOLPH, G.J. Chemokines and tissue injury. *American Journal of Pathology*, v. 146, n.6, p.1287-1301, 1995.

GARZETTI, G. G.; CIAVATTINI, A.; GOTERI, G. et al. HPV DNA positivity and natural killer cell activity in the clinical outcome of mild cervical dysplasia: integration between virus and immune system. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 39, n. 2, p. 130-135, 1995.

GEBHARD, B. et al. Different transendothelial migration behaviour pattern of blood monocytes derived from patients with benign and malignant diseases of the breast. **Anticancer Res**, v. 20, p. 4599-4604, 2000.

GHIO, M. et al. Transforming growth factor-beta1 in supernatants from stored red blood cells inhibits neutrophil locomotion. **Blood**, v. 102, p. 1100-1107, 2003.

GREEN, L. C. et al. Nitrate biosynthesis in man. . **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA.**, v. 78, p. 7764-7768, 1981.

GOGOS C.A., DROUOS E., BASSARIS H.P., *et al.* Pro-versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 2000;181: 176-80.

GORELIK, E. *et al.* Multiplexed immunobead-based cytokine profiling for early detection of ovarian cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14; 981–987, 2005.

HARA N., *et al.* Superoxide anion-generating activity of polymorphonuclear leukocytes and monocytes in patients with lung cancer. *Cancer*. 69:1682-1687, 1992.

HEIT, B. *et al.* An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration opposing chemotactic gradients. **The Journal of Cell Biology**, v. 159, n. 1, p. 91-102, 2002.

HICKEY, M. J.; SHARKEY, K. A. *et al.* Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. **Faseb J.**, v. 11, n. 12, Oct, p. 955-964, 1997.

ICHINOE M.; MIKAMI T.; SHIRAIISHI H.; OKAYASU I. High microvascular density is correlated with high VEGF, iNOS and COX-2 expression in penetrating growth-type early gastric carcinomas. **Histopathology**, v. 45, n. 6, p. 612-8, Dec. 2004.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde - Brasil. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer de colo de útero**, 2008 – 2009. www.inca.org.br

JABLONSKA, E. Serum levels of tumor necrosis factor alpha and production of this cytokine by polymorphonuclear cells in breast cancer patients. **Arch Immunol Ther Exp** 46:93-6, 1998.

JAISSWAL M.; LARUSSO N.F.; GORES G.J.; nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, Bethesda, v. 281, n.3 p. G626-34, Sept. 2001

KADONO, T. *et al.* Leukocyte Rolling Velocities and Migration are Optimized by Cooperative L-Selectin and Intracellular Adhesion Molecule-1 Functions. **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 4542-4550, 2002.

KASPRZYK, M. *et al.*, The assessment of acute phase proteins as prognostic factors in patients surgically treated for non-small cell lung cancer. **Pneumonol Alergol Pol.**, 2008; 76(5): 321-6.

KEEL, M. *et al.* Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood*, v. 90, p. 3356-3363, 1997.

KIM, J.M., *et al.* Apoptosis of human gastric epithelial cells via caspase-3 activation in response to Helicobacter pylori infection: possible involvement of neutrophils through tumor necrosis factor- α and soluble Fas ligands. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. 35: 40-48, 2000.

KOGA, Y., *et al.* Neutrophil-Derived TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL): A Novel Mechanism of Antitumor effect by Neutrophils. **Cancer Research**, 64, 1037-1043, 2004.

KURMAN, R. J., *et al.* Serous borderline (low malignant potential, atypical proliferative) ovarian tumors: workshop perspectives. **U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health** Aug; 35(8): 934-48, 2004

KURMAN, R. J.; SOLOMON, D. **The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses**. Bethesda: Springer-Verlag, 1994. 81p.

KURMAN, R.J. & MALKASIAN, G.D.; SEDLIS, A.; SOLOMON, D. From Papanicolaou to Bethesda: the rationale for a new clinical cytologic classification. **Obstet. Gynecol.**; v.77, p. 779-782, 1991.

KWIATKOWSKA, K. & SOBOTA, A. Signaling pathways in Phagocytosis. **BioEssays**, v. 21, p. 422-431, 1999.

LANG, S.; LAUFFER, L.; CLAUSEN, C. *et al.* Impaired monocyte function in cancer patients: restoration with a cyclooxygenase-2 inhibitor. **The FASEB Journal**, v. 17, p.286-288, 2003.

LEE, A.M.; CLEAR, A.J.; CALAMINICI, M.; *et al.* Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3- positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. **Jour. Clin. Oncol.** v.24, p.5052-5059, 2006.

LUKAC, J.; LECHPAMMER, S; KUSIC, Z. *et al.* Prognostic significance of phagocytic functions in breast cancer patients. **European Journal of Cancer**, v. 30A, p. 2185-2186, 1994.

LUTGENDORF S.K.; WEINRIB A.Z.; PENEDO F.; DEGEEST K.; HENDERSON P.J.; SEPTON S.E.; ROHLER N.; LUCCI J.A.; COLE S.; SOOD A.K.; LUBAROFF D.M. Interleukin-6, cortisol, and depressive symptoms in ovarian cancer patients. **Journal of Clinical Oncology** 2008 Oct 10;26(29):4820-7. Epub 2008 sep 8.

LYON, D. E. *et al.* Cytokine Comparisons Between Women With Breast Cancer and Women With a Negative Breast Biopsy. **Nurs Res**, v. 57, p. 51-58, 2008.

MacFADDEN, D. K.; SAITO, S.; PRUZANSKI, W. The effect of Chemotherapeutic Agents on Chemotaxis and Random Migration of Human Leucocytes. **Journal of Clinical Oncology**, v.3, p. 415-419, 1985.

MAGGI, R.; ZANNONI, E.; GIORDA, G.; BIRAGHI, P.; SIDERI, M. Comparison of repeat smear, colposcopy, and colposcopically directed biopsy in the evaluation of the mildly abnormal smear. **Gynecol Oncol.**, v. 35, p. 294-296, 1989.

MANTOVANI *et al.*, The yin-yang of tumor-associated neutrophils. **Cancer Cell** September 8, 2009

MANTOVANI, G.; MACCIÒ, A.; PISANO, M. et al. Tumor-associated lympho-monocytes from neoplastic effusions are immunologically defective in comparison with patient autologous PBMCs but are capable of releasing high amounts of various cytokines. **International Journal of Cancer**, v. 71, p. 724-731, 1997.

MASTROIANNI, C. M.; LICHTNER, M.; MENGONI, F. *et al.* Improvement in neutrophil and monocyte function during highly active antiretroviral treatment of HIV-1-infected patients. **AIDS**, v. 13, 883-890, 1999.

MENDONÇA, M. A. O; CUNHA, F. Q.; MURTA, E. F. C.; TAVARES-MURTA, B. M. Failure of neutrophil chemotactic function in breast cancer patients treated with chemotherapy. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 57, p. 663-670, 2006.

MESTRINER, F. L. et al. Acute-phase protein alpha-1-acid glycoprotein mediates neutrophil migration failure in sepsis by a nitric oxide-dependent mechanism. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, p. 19595-19600, 2007.

MUNÓZ, N.; Bosch FX, Sanjosé S, Shah KV. The role of HPV in the etiology of cervical cancer. **Mutat. Res.** v.305, p.293-301, 1994.

MUSTEA, A.; BRAICU, E.L.; KOENSGEN, D.; YUAN, S.; SUN, P.M.; STAMATIAN, F.; LICHTENEGGER, W.; CHEN F.C.; CHEKEROV, R.; SEHOLI, J. Monitoring of IL-10 in the serum of patients with advanced ovarian cancer: results from a prospective pilot-study. **Cytokine**. 2009 Jan; 45(1) : 8-11.

NEGUS, R. P. M.; STAMP, G. W. H.; HADLEY, J. et al. Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines. **American Journal of Pathology**, v.150, p. 1723-1734, 1997.

NEGUS, R. P. M.; STAMP, G. W. H.; RELF, M. G. et al. The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p. 2391-2396, 1995.

OTSUKA, Y.; NAGANO, K. *et al.* Inhibition of neutrophil migration by tumor necrosis factor. Ex vivo in vivo studies in comparison with in vitro effect. **J. Immunol.**, v. 145, p. 2639-2643, 1990.

PALO, G., *et al.* **Patología e Tratamento do Trato Genital Inferior (Incluindo Colposcopia)**. MEDSI Editora Médica e Científica Ltda. Cap. 1, pp. 97-104, 2002.

PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J. et al. Global cancer statistics, 2002. **CA: A Cancer Journal for Clinical**, v.55, p. 74-108, 2005. Disponível em: <<http://caonline.amcancersoc.org/cgi/content/full/55/2/74>>. Acesso em 31/01/2006.

PEREYRA, E. A. G.; PARELLADA, C.I. Entendendo melhor a infecção pelo Papilomavírus Hu,ano. **ARTSMED**, p. 1-1, 2003

PICCOLO, M. T.; SANNOMIYA, P. Inhibition of neutrophil chemotaxis by plasma of burned patients: effect of blood transfusion practice. **Burns** v. 21 (8), p. 569-574, 1995.

PICCOLO, M. T.; SANNOMIYA, P. Inibition of neutrophil chemotaxis by factor in alloxan-induced diabetic rat plasma. **Diabetes** v. 36, p. 1307-1314, 1987.

PICKERING, L. K.; ERICSSON, C. D.; KOHL, S. Effect of chemotherapeutic agents on metabolic and bactericidal activity of polymorphonuclear leukocytes. **Cancer**, v. 42, p. 1741-1746, 1978.

PÓKA R., SZÛCS S., ÁDÁNY R., SZIKSZAY E. Stege-related superoxide anion production of granulocytes of gynecologic cancer patients. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, 89:55-57, 2000.

PROOST, P.; WUYTS, A.; VAN DAMME, J. The role of chemokines in inflammation. **International Journal of Clinical & Laboratory Research**, v. 26, p. 211-223, 1996.

PUSZTAI, L. et al. Changes in plasma levels of inflammatory cytokines in response to paclitaxel chemotherapy. **Cytokine**, v. 25, n. 3, p. 94-102, 2004.

RIBEIRO, R. A.; SOUZA-FILHO, M. V.; SOUZA, M. H; OLIVEIRAS S. H.; COSTA, C. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, H. S. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, FMLP and C5a des arg. **International Archives of Allergy & Immunology**. V 112, p. 27-35, 1997.

REAGAN, J.W., SEIDERMAN, I.L., & SARACUSA, Y. The cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of the uterine cervix. **Cancer**, v.6, p.224-235, 1953.

RICHART, R.M. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. **Obstet. Gynecol.**, v. 75, nº1, p.131-133, 1990.

ROSSI, D & ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annual Review of Immunology**, v.18, p. 217-242, 2000.

SCHIMIDT, H. H. H. W. et al. Ezymatic formation of nitrogen oxides from L-arginine in bovine brain cytosol. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, v. 165, p. 284-291, 1989.

SELLORS, J.W.; SANKARANARAYANAN, D. R. **Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical**. Edited by R. Sankaranarayanan and Ramani S. Wesley. p. 52-80, 2004.

SELLORS, J.W.; SANKARANARAYANAN, D.R. **Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical**. Edited by R. Sankaranarayanan and Ramani S. Wesley. P. 52-80, 2003.

SHARMA, A.; RAJAPPA, M.; SHARMA, M. Cytokines (TH1 and TH2) in patients with advanced cervical cancer undergoing neoadjuvant chemoradiation: correlation with treatment response. **International Journal Gynecol Cancer**. Oct; 19 (7): 1269-75, 2009

SHERMAN, M. E.; CASTLE, P. E.; SOLOMON, D. Cervical Cytology of Atypical Squamous Cells cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H) Characteristics and Histologic Outcomes. **Cancer Cytopathol.**, v. 108, n. 5, p. 298-305, 2006.

SOLOMON, D. The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. Developed and approved at the National Cancer Institute Workshop, Bethesda, Maryland, USA, December, 12-13. **Acta. Cytol.**, v.33, p.567-574, 1989.

SOLOMON, D.; DAVEY, D.; KURMAN, R.; MORIARTY, A.; O'CONNOR, D.; PREY, M. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**. Apr. 24, n°287, v.16, p.2114-2119, 2002.

SPERTINI, O. *et al.*, Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with a inducible endothelial cell ligando to support leucocyte adhesion. **The Journal of Immunology**, v. 147, p. 2565, 1991.

SUGAWARA, T.; MIYAMOTO, M.; TAKAYAMA, S. et al. Separation of neutrophils from blood in human and laboratory animals and comparison of the chemotaxis. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 33, p. 91-100, 1995.

SUSS, J.; BAKACS, T.; RINGWALD, G. Increased number of phagocytic cells among the peripheral blood lymphocytes of mammary tumor patients. **Allerg Immunol**, v.30, n. 3, p. 183-187, 1984.

STUART, L. M & EZEKOWITZ, A. B. Phagocytosis: elegant complexity. **Immunity**, v. 22, p. 539-550, 2005.

TAVARES-MURTA B.M., MACHADO, J.S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA F.Q. Nitric Oxide Mediates the Inhibition of Neutrophil Migration Induced by Systemic Administration of LPS. **Inflammation**, 25: 247-253, 2001

TAVARES-MURTA, B. M.; CUNHA, F. Q. & FERREIRA, S. H. The intravenous administration of tumor necrosis factor alpha, interleukin 8 and macrophage-derived neutrophil chemotactic factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production. **British Journal of Pharmacology**, v. 124, p. 1369-1374, 1998.

TAVARES-MURTA, B. M.; ZAPAROLI, M.; FERREIRA, R. B. et al. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 5, p. 1056-1061, 2002.

THOMSEN L.L.; MILES D.W.; HAPPERFIELD L.; BOBROW L.G.; KNOWLES R.G.; MOSCADA S. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. **Br J. Cancer**, London, v 72,n. 41-4, july 1995.

THORLAND, E. C.; MYERS, S. L.; PERSING, D. H. et al. Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. **Cancer Research**, v. 60, n. 21, p. 5916-5921, 2000.

VAN DER POLL, T. et al. Effects of IL-10 on systemic inflammatory responses during sublethal primate endotoxemia. **Journal Immunology**, v. 158, n. 4, p. 1971-1975, 1997.

WAGNER, J.G.; ROTH, R.A. Neutrophil migration during endotoxemia. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 66, p. 10, 1999.

WAHL, L. M. & KLEINMAN, H. K. Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, p. 1583-1584, 1998.

WAUGH D.J.; WILSON C. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clinical Cancer Research**. Nov 1;14(21):6735-41, 2008

WILLIAMS, L.M. & RUDENSKY, A.Y. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. **Nat. Immunol.** v.8, p.277-284, 2007.

Anexos

Anexo A. Tabela de identificação do grupo de controles quanto à idade.

Controles	Idade (anos)
C1	37
C2	39
C3	52
C4	50
C5	26
C6	55
C7	35
C8	51
C9	30
C10	36
C11	40
C12	41
C13	37
C14	33
C15	65
C16	37
C17	27
C18	39
C19	54
C20	30
C21	44
C22	51
C23	33
C24	42
C25	55
C26	33
C27	45
C28	45
C29	57
C30	44
C31	46
C32	38
C33	65
C34	41
C35	47
C36	26

Os Controles estão representados C + n° de C1 a C36.

Anexo B: Migração de neutrófilos controles tratados com soro (0,5%, 5,0% e 50%) de pacientes com neoplasia de colo uterino em diferentes estadiamentos, antes e após tratamento cirúrgico.

a. Pré Tratamento:

Pacientes	Estadiamento	RPMI			FMLP			LTB ₄			IL-8		
		0,5%	5%	50%	0,5%	5%	50%	0,5%	5%	50%	0,5%	5%	50%
P4	NIC III	2,2	1,0	0,5	2,6	5,3	1,4	2,1	1,8	1,0	1,9	0,8	1,0
P5	NIC III	2,5	1,3	0,6	25,6	3,9	3,3	6,6	2,0	0,6	13,4	5,4	3,5
P6	NIC III	2,9	1,8	1,1	17,5	2,9	2,1	20,5	5,1	5,1	15,3	10,1	2,0
P7	NIC III	4,0	5,5	4,0	17,3	5,4	3,4	20,4	8,6	5,1	10,0	5,5	3,9
P8	NIC III	7,8	6,3	2,9	14,9	9,4	5,4	21,6	12,3	9,5	20,9	11,5	4,3
P19	CA IA1	0,9	1,0	0,8	16,5	6,5	6,5	13,5	3,1	3,6	1,4	1,0	0,9
P20	CA IA1	1,8	2,0	1,1	16,3	2,8	0,8	6,1	2,1	1,4	14,3	1,3	0,9
P21	CA IA1	4,0	1,9	1,3	36,3	12,5	4,8	38,6	6,1	1,5	28,9	6,5	4,1
P22	CA IA1	2,5	4,9	5,3	18,3	10,5	4,6	21,4	10,9	5,9	14,6	8,9	5,1
P23	CA IA1	7,5	3,5	4,3	14,0	10,0	5,5	19,0	12,3	5,9	10,4	6,8	4,6
P25	CA IIIA	1,6	1,1	0,8	8,4	5,5	2,3	8,3	1,1	1,0	1,5	0,8	0,8
P34	CA IIB	2,3	1,4	1,3	9,4	4,5	4,3	6,9	1,6	2,8	10,6	3,8	1,8
P35	CA IIB	3,3	1,9	1,0	9,4	6,0	2,8	6,0	3,1	2,1	9,8	4,0	1,5
P42	CA IIIB	4,1	3,6	3,4	25,6	19,6	3,8	20,6	13,4	7,1	38,1	13,8	3,6
P43	CA IIIB	3,8	3,0	2,5	24,4	20,8	8,9	24,3	14,3	7,5	23,1	11,5	4,4

As pacientes com neoplasia de colo uterino estão representadas P + nº; NIC – neoplasia intraepitelial cervical; CA – carcinoma. Os resultados indicam a média do número de neutrófilos emigrados por campo, sendo que foram contados 10 campos.

b. Pós Tratamento:

Pacientes	Estadiamento	RPMI			FMLP			LTB ₄			IL-8		
		0,5%	5%	50%	0,5%	5%	50%	0,5%	5%	50%	0,5%	5%	50%
P4	NIC III	1,7	1,6	1,9	20,7	23,8	15,8	13,4	11,8	12,7	10,6	11,6	14,0
P5	NIC III	1,6	1,8	1,7	19,9	21,4	22,8	9,5	9,2	12,9	10,4	9,6	18,3
P6	NIC III	1,2	1,7	1,3	12,5	14,1	20,6	11,7	13,4	13,4	10,9	17,4	12,8
P7	NIC III	1,6	1,5	1,5	13,1	14,5	12,2	11,7	12,8	11,1	12,2	11,4	11,2
P8	NIC III	1,3	1,4	1,6	14,3	12,3	12,3	12,0	10,6	11,4	10,1	11,2	11,6

As pacientes com neoplasia de colo uterino estão representadas P + n°; NIC – neoplasia intraepitelial cervical. Os resultados indicam a média do número de neutrófilos emigrados por campo, sendo que foram contados 10 campos.

Anexo C: Quimiotaxia de neutrófilos normais tratados com soro (50%) heterólogo de controles.

Controles	RPMI	FMLP	LTB ₄	IL-8
C1	3,4	10,8	12,3	7,8
C4	4,1	34	14,9	32,4
C8	1,5	21,8	13,8	10,5
C10	5,6	72,4	52,4	42,6
C13	5,3	23,6	36,6	37,3
C16	1,8	12,9	11,7	13,0
C17	1,0	12,1	12,3	19,4

Os resultados indicam a média do número de neutrófilos emigrados por campo, sendo que foram contados 10 campos.

Anexo D: Tabela de quantificação das citocinas no soro de pacientes com neoplasia de colo uterino, antes e após tratamento cirúrgico.

Pacientes	Estadiamento	TNF α		IL-6		IL-8		IL-10	
		Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
P1	NIC II/III	0,07	0,00	5,89	2,37	7,12	0,00	7,49	3,49
P2	NIC II/III	3,38	0,05	3,08	2,75	2,48	8,16	10,34	6,65
P3	NIC III	0,00	6,67	2,00	4,54	12,75	2,29	4,80	7,27
P4	NIC III	0,91	0,00	3,52	1,09	2,70	2,07	4,24	3,31
P5	NIC III	2,72	0,00	3,63	2,19	2,11	1,54	13,95	1,83
P6	NIC III	2,39	1,57	19,01	2,81	9,74	13,95	6,59	8,15
P7	NIC III	2,55	2,06	2,24	1,26	15,56	11,16	7,81	4,16
P8	NIC III	0,03	0,09	13,35	7,02	12,25	3,12	7,56	6,81
P9	NIC III	0,00	-	1,97	-	26,47	-	0,04	-
P10	NIC III	3,05	-	6,01	-	2,62	-	2,23	-
P11	NIC III	0,00	-	15,51	-	16,01	-	15,11	-
P12	NIC III	0,00	0,00	2,47	2,18	0,02	4,93	5,03	6,85
P13	NIC III	0,00	0,00	0,99	3,46	3,28	4,15	6,01	9,68
P14	NIC III	0,00	-	8,43	1,84	6,33	0,46	6,62	7,00
P15	NIC III/HPV	0,00	-	3,90	-	12,29	-	-	-
P16	NIC III/HPV	1,46	0,00	9,51	1,42	33,21	2,54	7,45	5,03
P17	NIC III/HPV	0,00	-	2,74	-	2,01	-	5,63	-
P18	Mama + NIC III	0,00	0,00	4,04	4,01	21,01	2,00	7,31	6,17
P19	CA IA1	0,00	-	11,65	-	1,10	-	2,47	-
P20	CA IA1	0,00	-	2,56	-	2,55	-	0,77	-
P21	CA IA1	0,00	-	1,95	-	2,72	-	4,06	-
P22	CA IA1	0,00	-	4,68	-	2,02	-	8,56	-
P23	CA IA1	0,03	-	2,07	-	11,52	-	28,63	-
P24	CA IIA	1,90	-	3,85	-	6,87	-	11,84	-
P25	CA IIIA	0,04	-	18,42	-	13,88	-	2,43	-
P26	CA IIIA	0,00	0,00	8,59	1,93	8,11	4,87	8,88	6,32
P27	CA IB1	0,08	0,00	26,97	27,13	-	-	16,65	9,07
P28	CA IB2	0,00	0,00	0,00	1,32	0,50	1,66	5,17	6,14
P29	CA IB2	0,00	0,00	3,85	6,43	17,2	-	7,50	-
P30	CA IB2	0,05	0,00	4,30	4,20	12,84	4,15	15,62	8,30
P31	CA IIB	0,00	-	3,41	-	6,70	-	2,35	-
P32	CA IIB	0,00	-	4,92	-	2,86	-	20,68	-
P33	CA IIB	0,00	-	17,58	-	9,08	-	8,72	-
P34	CA IIB	7,83	-	6,00	-	15,39	-	5,46	-
P35	CA IIB	0,00	-	4,90	-	4,51	-	0,06	-
P36	CA IIB	0,00	-	15,81	-	5,59	-	8,98	-
P37	CA IIB	0,00	-	13,53	-	25,66	-	10,26	-
P38	CA IIB	1,40	0,00	12,26	3,89	-	-	19,07	5,22
P39	CA IIB	0,09	-	19,17	-	1,26	-	7,94	-
P40	CA IIIB	0,00	-	7,74	-	19,29	-	2,16	-
P41	CA IIIB	6,01	-	15,85	-	28,00	-	11,18	-
P42	CA IIIB	0,00	-	5,20	-	13,44	-	8,78	-
P43	CA IIIB	0,08	-	6,60	-	32,00	-	8,85	-
P44	CA III B	0,00	-	4,52	-	16,01	-	12,43	-
P45	CA IVB	0,00	-	14,29	-	11,25	-	0,52	-

As pacientes com neoplasia de colo uterino estão representadas P + n° de P1 a P45, respectivamente. Os valores 0,00 (zero) indicam, nestas amostras, níveis não detectados da respectiva citocina. Os hífen (-) indicam que o ensaio não foi realizado. Os resultados foram expressos em pg/ml.

Anexo E: Tabela de quantificação das citocinas no soro de Controles.

Controles	TNF- α	IL-6	IL-8	IL-10
C19	6,34	6,28	21,91	15,54
C20	0,00	0,71	1,27	8,51
C21	0,00	3,39	10,17	5,53
C22	0,00	3,85	2,11	10,81
C23	0,00	15,82	2,94	12,88
C24	0,00	2,42	2,38	6,32
C25	0,00	1,68	7,71	6,46
C26	0,00	1,51	48,22	9,04
C27	0,00	1,07	0,84	8,19
C28	0,00	0,00	0,00	1,11
C29	0,00	1,40	0,00	3,90
C30	0,00	1,44	0,43	6,48
C31	0,00	3,19	6,67	18,46

Os Controles estão representados C + n° de C19 a C31, respectivamente. Os valores 0,00 (zero) indicam, nestas amostras, níveis não detectados da respectiva citocina. Os resultados foram expressos em pg/ml.

Anexo F: Tabela de quantificação de metabólitos do óxido nítrico em amostras de soro de controles.

Controles	NO ₂ + NO ₃ (µM)
C1	26,1
C2	39,4
C3	24,7
C4	31,2
C5	31,4
C6	49,9
C7	19,4
C8	50,1
C9	23,6
C10	34,3
C11	49,7
C12	33,0
C13	49,7
C14	49,9
C15	30,3
C16	24,1
C17	11,9
C18	8,8
C19	27,9
C20	15,4
C21	10,5
C22	5,0
C23	5,9
C24	8,8
C25	36,4
C26	10,4
C27	11,1
C28	30,0
C29	18,9

Os Controles estão representados C + n° de C1 a C29 respectivamente.

Anexo G: Tabelas de quantificação de metabólitos de óxido nítrico no soro de pacientes com neoplasia de colo uterino, divididas quanto ao estadiamento, antes e após tratamento cirúrgico.

a. NIC

Pacientes	Estadiamento	NO ₂ + NO ₃ (µM)	
		Pré	Pós
P1	NIC II/III	15,78	14,66
P2	NIC II/III	12,68	11,91
P3	NIC III	18,28	6,57
P4	NIC III	6,48	19,66
P5	NIC III	16,90	8,89
P10	NIC III	40,85	23,53
P11	NIC III	8,29	3,98
P12	NIC III	10,70	10,96
P13	NIC III	7,60	11,39
P14	NIC III	41,00	24,90
P16	NIC III/HPV	20,09	20,43
P17	NIC III/HPV	29,91	10,10
P18	Mama + NIC III	18,97	13,63

As pacientes com neoplasia de colo uterino estão representadas P + n°.

b. Micro

Pacientes	Estadiamento	NO ₂ + NO ₃ (µM)	
		Pré	Pós
P19	CA IA1	45,65	39,20
P20	CA IA1	57,45	24,70
P21	CA IA1	104,9	41,60
P22	CA IA1	58,80	30,50

As pacientes com neoplasia de colo uterino estão representadas P + n°.

c. Invasivo

Pacientes	Estadiamento	NO ₂ + NO ₃ (µM)	
		Pré	Pós
P29	CA IB2	65,90	53,90
P30	CA IB2	48,30	37,90
P32	CA IIB	35,60	19,80
P33	CA IIB	36,30	21,20
P34	CA IIB	28,30	25,60
P35	CA IIB	50,50	45,00
P36	CA IIB	48,10	57,00
P37	CA IIB	26,90	38,50
P38	CA IIB	29,60	17,40

As pacientes com neoplasia de colo uterino estão representadas P + n°.

Anexo H: Tabela de quantificação das citocinas no sobrenadante da cultura de neutrófilos de pacientes com neoplasia de colo uterino antes e após tratamento cirúrgico.

Pacientes	Estadiamento	TNF- α		IL-6		IL-10	
		Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
P3	NIC III	7,01	3,85	9,01	4,90	2,38	3,06
P4	NIC III	3,85	9,52	57,00	41,71	0,00	6,58
P5	NIC III	0,92	2,15	52,27	59,52	1,01	0,00
P25	CA IIIA	6,46	3,82	16,81	113,19	2,64	2,00
P26	CA IIIA	11,26	8,74	18,06	8,15	3,50	6,81
P27	CA IB1	8,01	8,81	7,15	8,88	3,22	4,04

As pacientes com neoplasia de colo uterino estão representadas P + n°. Os valores 0,00 (zero) indicam, nestas amostras, níveis não detectados da respectiva citocina. As células foram estimuladas por LPS (1 μ g/ml) e os sobrenadantes coletados após 24h. Os resultados foram expressos em pg/ml.

Anexo I: Tabela de quantificação de NO₂+ NO₃ (μ M) no sobrenadante da cultura de neutrófilos e células mononucleares de pacientes com neoplasia de colo uterino antes e após tratamento cirúrgico.

Pacientes	Estadiamento	Neutrófilos		Mononucleares	
		Pré	Pós	Pré	Pós
P3	NIC III	6,80	8,90	9,00	12,50
P4	NIC III	7,50	8,80	9,80	13,50
P5	NIC III	8,50	8,90	12,40	10,30
P25	CA IIIA	6,50	7,10	13,60	10,60
P26	CA IIIA	8,50	6,60	10,10	10,90
P27	CA IB1	5,60	6,80	10,00	10,30

As pacientes com neoplasia de colo uterino estão representadas P + n°. Os valores 0,00 (zero) indicam, nestas amostras, níveis não detectados da respectiva citocina. Os resultados foram expressos em μ M. As células foram estimuladas por LPS (1 μ g/ml) e os sobrenadantes coletados após 24h (neutrófilos) ou 48h (mononucleares).

Anexo J: Tabela de quantificação das citocinas no sobrenadante da cultura de neutrófilos de controles.

Controles	TNF- α	IL-6	IL-10
C1	3,35	2,62	0,33
C2	2,28	8,67	1,20
C3	5,21	29,24	0,51
C4	0,92	6,46	0,00
C5	4,83	31,99	0,51
C6	5,58	63,25	1,26
C7	1,91	49,53	0,00

Os controles estão representados C + nº. Os valores 0,00 (zero) indicam, nestas amostras, níveis não detectados da respectiva citocina. As células foram estimuladas por LPS (1 μ g/ml) e os sobrenadantes coletados após 24h. Os resultados foram expressos em pg/ml.

Anexo K: Tabela de concentração de nitrito nos sobrenadantes de neutrófilos e células mononucleares de controles.

Controles	NO	
	Neutrófilos	Mononucleares
C1	7,30	3,30
C2	8,90	1,40
C3	10,20	2,00
C4	11,40	3,00
C5	11,70	3,80
C6	14,00	2,50
C7	9,80	2,80
C8	-	1,90

Os Controles estão representados C + nº. Os hífen (-) indicam que o ensaio não foi realizado.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - Uberaba-MG
Comitê de Ética em Pesquisa- CEP

PROJETO: Mecanismos envolvidos na alteração da função de neutrófilos em pacientes com neoplasia de colo uterino.

TERMO DE ESCLARECIMENTO

As doenças que aparecem no colo do útero das mulheres têm sido uma grande preocupação para todos da área de saúde. No nosso sangue existem as células de defesa (leucócitos), que em vários tipos de doenças podem estar defeituosas, perdendo a capacidade de ir até o local da doença e lutar contra ela. O que nós queremos estudar é porque esses defeitos podem acontecer, dependendo do tipo da doença do colo uterino e como o tratamento muda a função dessas células. Se você concordar em participar, será do grupo controle, de mulheres normais. Para isso precisamos colher seu sangue, usando material esterilizado e descartável. Seu sangue servirá para estudar a função das suas células de defesa em comparação com o grupo de pacientes. Os resultados desse trabalho poderão ajudar a descobrir outras formas de melhorar a defesa do organismo contra a neoplasia de colo uterino. O sangue coletado será usado para os exames da pesquisa e seu nome em nenhum momento será divulgado. Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

Eu, _____, residente em _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para retirar meu consentimento e deixar de participar da pesquisa, a qualquer momento, sem justificar minha decisão. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.

Uberaba, / / .

Assinatura do voluntário

Assinatura do pesquisador responsável

Pesquisadores Responsáveis: Profa. Beatriz Martins Tavares Murta e Prof. Eddie Fernando Candido Murta

Telefone de contato dos pesquisadores: (0x34)3318-5467 / 3318-5326

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



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - Uberaba-MG
Comitê de Ética em Pesquisa- CEP

PROJETO: Mecanismos envolvidos na alteração da função de neutrófilos em pacientes com neoplasia de colo uterino.

TERMO DE ESCLARECIMENTO

As doenças que aparecem no colo do útero das mulheres têm sido uma grande preocupação para todos da área de saúde. No nosso sangue existem as células de defesa (leucócitos), que em vários tipos de doenças podem estar defeituosas, perdendo a capacidade de ir até o local da doença e lutar contra ela. O que nós queremos estudar é porque esses defeitos podem acontecer, dependendo do tipo da doença do colo uterino e como o tratamento muda a função dessas células. Para isso precisamos colher seu sangue, usando material esterilizado e descartável. Seu sangue servirá para estudar como está a função das suas células de defesa antes e depois do tratamento para sua doença. Os resultados desse trabalho poderão ajudar a descobrir outras formas de melhorar a defesa do organismo contra a doença. O sangue coletado será usado para os exames da pesquisa e seu nome em nenhum momento será divulgado. Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu tratamento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

Eu, _____, residente em _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para retirar meu consentimento e deixar de participar da pesquisa, a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.

Uberaba, / / .

Assinatura do paciente ou seu responsável legal

Documento de identidade

Assinatura do pesquisador responsável

Pesquisadores Responsáveis: Profa. Beatriz Martins Tavares Murta e Prof. Eddie Fernando Candido Murta

Telefone de contato dos pesquisadores: (0x34)3318-5467 / 3318-5326

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)