

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular

Adriana Torres da Silva

**EXPRESSÃO DE MARCADORES IMUNOFENOTÍPICOS EM
MONONUCLEARES SANGUÍNEOS DE PACIENTES COM CARCINOMA DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO**

Belo Horizonte

2020

Adriana Torres da Silva

**EXPRESSÃO DE MARCADORES IMUNOFENOTÍPICOS EM
MONONUCLEARES SANGUÍNEOS DE PACIENTES COM CARCINOMA DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Medicina Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Andy Petroianu

Belo Horizonte

2020

SI586e Silva, Adriana Torres da.
Expressão de marcadores Imunofenotípicos em mononucleares sanguíneos de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço [recursos eletrônicos]. / Adriana Torres da Silva. - - Belo Horizonte: 2020.
64f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Andy Petroianu.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Carcinoma de Células Escamosas. 2. Imunofenotipagem. 3. Leucócitos Mononucleares. 4. Cabeça. 5. Pescoço. 6. Dissertação Acadêmica. I. Petroianu, Andy. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QZ 365



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

Atesto para os devidos fins que a defesa de dissertação da aluna **ADRIANA TORRES DA SILVA**, intitulada "*EXPRESSÃO DE MARCADORES IMUNOFENOTÍPICOS EM MONONUCLEARES SANGUÍNEOS DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO*", defendida em 25 de agosto de 2020, foi composta pela seguinte banca examinadora: Andy Petroianu- UFMG- Orientador, Luiz Paulo Kowalski (FMUSP), Ricardo Santiago Gomez (UFMG).

Belo Horizonte, 29 de agosto de 2023.

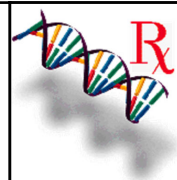
Luiz Armando Cunha de Marco
Coordenador do Programa de Pós- Graduação em Medicina Molecular



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Armando Cunha de Marco, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 29/08/2023, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2584383** e o código CRC **B504CCC2**.



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA **ADRIANA TORRES DA SILVA**

Realizou-se, no dia 25 de agosto de 2020, às 09:00 horas, Plataforma Lifesize, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada **EXPRESSÃO DE MARCADORES IMUNOFENOTÍPICOS EM MONONUCLEARES SANGUÍNEOS DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO**, apresentada por ADRIANA TORRES DA SILVA, número de registro 2018651913, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Andy Petroianu - Orientador (UFMG), Prof(a). Luiz Paulo Kowalski (FMUSP), Prof(a). Ricardo Santiago Gomez (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 25 de agosto de 2020.

Prof(a). Andy Petroianu (Doutor)

Digitally signed by LUIZ ARMANDO
CUNHA DE MARCO:09902856187
DN: c=BR, o=ICP-Brasil, ou=(EM
BRANCO), ou=16636540000104,
ou=AC PRODEMG RFB, ou=RF
CPF A3, ou=Secretaria da Receit
Federal do Brasil - RFB, cn=LUIZ
ARMANDO CUNHA DE
MARCO:09902856187
Date: 2020.08.26 15:57:18 -03'00

Prof(a). Luiz Paulo Kowalski (Doutor)

Prof(a). Ricardo Santiago Gomez (Doutor)

*A quem me ensinou a não ser just another
brick in the wall.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) por motivar meu crescimento e amadurecimento acadêmico, pessoal e profissional.

“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende.”

(Guimarães Rosa)

ARTIGO 1

IMUNO-ONCOLOGIA EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO (HNSCC)

RESUMO

INTRODUÇÃO: A Imuno-oncologia estuda o sistema imunitário de pacientes com câncer. Nas últimas décadas, a imunoterapia tem obtido boa resposta ao tratamento de vários tipos de câncer localmente avançados e metastáticos, por mecanismos do sistema imunitário do próprio paciente para potencializar sua resposta imunitária, atuando nos mecanismos de escape do tumor. **OBJETIVO:** Estudar os mecanismos imunitários envolvidos em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) e sua aplicação em imunoterapia por intermédio de biomarcadores. **MÉTODO:** Revisão da literatura baseada em referências pesquisadas no PUBMED, LILACS, MEDLINE, WHOLIS e SCIELO, usando as palavras chave carcinoma de células escamosas, cabeça e pescoço, imuno-oncologia, imunoterapia, imunologia. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Para pacientes com diagnóstico de HNSCC, as principais drogas aprovadas atualmente para uso clínico são o Pembrolizumabe e Nivolumabe, ambas classificadas como inibidores de *check point* (inibidoras do receptor PD-1 de linfócitos T), com melhora da sobrevida e da qualidade de vida. Diversos autores e ensaios clínicos apontam que sua indicação é condicionada à dosagem de PD-L1 (ligante expresso principalmente por células tumorais) que não é um biomarcador fidedigno na seleção dos pacientes. **CONCLUSÃO:** A imunoterapia é indicada para pacientes com HNSCC localmente avançado metastático e vem evoluindo com drogas inibidoras do receptor PD-1 de linfócitos T, cuja indicação está condicionada a biomarcadores fidedignos, que devem ser identificados para obter-se sucesso terapêutico.

Palavras-chave: câncer; cabeça e pescoço; carcinoma de células escamosas; imuno-oncologia; imunologia; imunoterapia.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Immuno-oncology studies the immune system of cancer patients. In the last decades, immunotherapy has obtained a good response to the treatment of several types of locally advanced and metastatic cancers, by mechanisms of the patient's own immune system to enhance their immune response, acting on the tumor's escape mechanisms. **OBJECTIVE:** To study the immune mechanisms involved in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and their application in immunotherapy through biomarkers. **METHOD:** Literature review based on references researched at PUBMED, LILACS, MEDLINE, WHOLIS and SCIELO, using the keywords squamous cell carcinoma, head and neck, immuno-oncology, immunotherapy, immunology. **RESULTS AND DISCUSSION:** The main drugs currently approved for clinical use in patients diagnosed with HNSCC, are Pembrolizumab and Nivolumab, both classified as check point inhibitors (inhibitors of the T-lymphocyte PD-1 receptor), with improved survival and quality of life. Several authors and clinical trials indicate that its indication is conditioned to the dosage of PD-L1 (ligand expressed mainly by tumor cells), which is not a reliable biomarker in the selection of patients. **CONCLUSION:** Immunotherapy is indicated for patients with locally advanced metastatic HNSCC and has been evolving with PD-1 T-lymphocyte receptor inhibitor drugs, the indication of which is dependent on reliable biomarkers, which must be identified in order to achieve therapeutic success.

Keywords: cancer; head and neck; squamous cell carcinoma; immuno-oncology; immunology; immunotherapy.

ARTIGO 2

EXPRESSÃO DE MARCADORES IMUNOFENOTÍPICOS EM MONONUCLEARES SANGUÍNEOS DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO

RESUMO

INTRODUÇÃO: Pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) apresentam defeitos na imunidade celular com enfoque nos linfócitos T. Células supressoras são induzidas por HNSCC com consequente comprometimento imunitário. **OBJETIVO:** Analisar funções celulares imunitárias em pacientes com HNSCC. **MÉTODO:** Foi realizada imunofenotipagem por citometria de fluxo de células mononucleares sanguíneas de dois grupos de homens adultos (n = 14): grupo 1 - com diagnóstico de HNSCC (boca, laringe e hipofaringe) e grupo 2 - voluntários, saudáveis e sem uso de drogas. Os grupos celulares estudados foram os linfócitos T (CD4, CD8, CD69), linfócitos B (CD19, CD69), neutrófilos (CD11a, CD16, CD66b, HLA-DR) e monócitos (CD14, CD86). **RESULTADOS:** No grupo 1, houve aumento de linfócitos T CD4+ e de células NK CD56+, bem como de linfócitos B CD19+ expressando o marcador de ativação precoce CD69, além de diminuição de neutrófilos expressando CD11a. Já os números de linfócitos T CD4+ e CD8+ expressando CD69, de monócitos expressando CD14 e CD86 e de neutrófilos expressando CD16, CD66b e HLA-DR não foram diferentes entre os dois grupos. **CONCLUSÃO:** A presença de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço desencadeia uma resposta inflamatória sistêmica associada a aumento do número de linfócitos T CD4+, bem como de linfócitos B CD19+, expressando o marcador de ativação precoce CD69, e células natural killer CD56+. Por outro lado, diminui o número total de neutrófilos CD11a. O número de linfócitos T CD8+, de neutrófilos CD16+, CD66b+, HLA-DR e de monócitos CD14+ e CD86+ não foi alterado por essa neoplasia.

Palavras-chave: carcinoma de células escamosas; cabeça e pescoço; imunofenotipagem; via aerodigestiva superior; linfócitos; neutrófilos; mononucleares.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) have defects in cellular immunity with a focus on T lymphocytes. Suppressor cells are induced by HNSCC with consequent immune compromise. **OBJECTIVE:** To analyze immune cell functions in patients with HNSCC. **METHOD:** Immunophenotyping was performed using flow cytometry of blood mononuclear cells from two groups of adult men (n = 14): group 1 - diagnosed with HNSCC (mouth, larynx and hypopharynx) and group 2 - volunteers, healthy and without use of drugs. The cell groups studied were T lymphocytes (CD4, CD8, CD69), B lymphocytes (CD19, CD69), neutrophils (CD11a, CD16, CD66b, HLA-DR) and monocytes (CD14, CD86). **RESULTS:** In group 1, there was an increase in CD4+ T lymphocytes and CDK NK cells, as well as CD19 B lymphocytes expressing the early activation marker CD69, in addition to a decrease in neutrophils expressing CD11a. The numbers of CD4+ and CD8+ T lymphocytes expressing CD69, monocytes expressing CD14+ and CD86+ and neutrophils expressing CD16, CD66b and HLA-DR were not different between the two groups. **CONCLUSION:** The presence of squamous cell carcinoma of the head and neck triggers a systemic inflammatory response associated with an increase in the number of CD4 T lymphocytes, as well as CD19+ B lymphocytes, expressing the CD69 early activation marker and CD56 natural killer cells. On the other hand, the total number of CD11a neutrophils decreases. The number of CD8+ T lymphocytes, CD16+ neutrophils, CD66b+, HLA-DR and CD14+ and CD86+ monocytes was not altered by this neoplasm.

Keywords: squamous cell carcinoma; head and neck; immunphenotyping; upper aerodigestive tract; lymphocytes; neutrophils; mononuclear.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Homens com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, distribuídos por idade, local de origem e estadiamento do tumor35
Tabela 2	Quantificação (média + desvio padrão da média) dos imunofenótipos de linfócitos em 14 pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (grupo 1) e 14 voluntários sadios (grupo 2), todos do sexo masculino37
Tabela 3	Quantificação (média + desvio padrão da média) dos imunofenótipos de monócitos em 14 pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (grupo 1) e 14 voluntários sadios (grupo 2), todos do sexo masculino38
Tabela 4	Quantificação (média + desvio padrão da média) dos imunofenótipos de neutrófilos em 14 pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (grupo 1) e 14 voluntários sadios (grupo 2), todos do sexo masculino39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Antigen presentation cell
CA	Califórnia
CD	Cluster of diferenciation
CTLA	Cytotoxic protein of T lymphocytes associated
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EUA	Estados Unidos da América
FACS	Fluorescence activated. Cell sorter
FDA	Food and Drug Administration
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Ângulo de dispersão frontal
HLA-DR	Human leukocyte antigen
HNSCC	Head and neck scamous cell carcinoma
HPV	Human papillomavirus
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LILACS	Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde
MEDLINE	Medical Literature Analysis and Retrieval System Online

MFI	Median fluorescence intensity
MHC	Major histocompatibility complex
NK	Natural killer
PBS	Phosphate buffered saline
PD	Programmed cell death
PD-L	Programmed cell death ligant
PE	Ficoeritrina
RNA	Ribonucleic acid
SCIELO	Scientific electronic library online
SSC	Ângulo de dispersão lateral
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- β	Transforming growth factor beta
Th	Linfócito T auxiliar
TNM	Tumor Node Metastasis
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
μ	Número médio da relação linfócitos/monócitos/neutrófilos
σ	Desvio padrão comum
Z α	Percentil da distribuição normal do nível de significância
Z β	Percentil da distribuição normal do poder do teste

SUMÁRIO

ARTIGO 1.....	16
IMUNO-ONCOLOGIA EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO (HNSCC)	16
INTRODUÇÃO	17
MÉTODO	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS.....	26
ARTIGO 2.....	29
EXPRESSÃO DE MARCADORES IMUNOFENOTÍPICOS EM MONONUCLEARES SANGUÍNEOS DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO	29
INTRODUÇÃO	30
MÉTODO	32
RESULTADOS.....	35
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS.....	46
ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FHEMIG	50
ANEXO B - RENOVAÇÃO DA CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FHEMIG.....	52
ANEXO C - IDENTIFICAÇÃO, ANAMNESE, FATORES DE RISCO E MARCADORES IMUNITÁRIOS	53
ANEXO D – IMUNOFENOTIPAGENS DE PACIENTES E CONTROLES	56

ARTIGO 1

**IMUNO-ONCOLOGIA EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA
E PESCOÇO (HNSCC)**

INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) compreende uma variedade de tumores de cavidade oral, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe e laringe com diferenças em sua epidemiologia, etiologia e abordagem terapêutica. O HNSCC é a sexta neoplasia maligna mais comum no mundo, sendo responsável por aproximadamente 6% de todos os cânceres e por até 2% das mortes por câncer. Seus fatores desencadeantes mais comuns são uso de tabaco e álcool, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, nitrosaminas, aldeídos, amins aromáticas, bem como papilomavírus humano subtipo 16. [1,2]

Os agentes carcinogênicos causam mutações e alterações epigenéticas nos oncogenes e genes supressores de tumor, desencadeando a proliferação celular descontrolada e a formação de tumores malignos. O HNSCC é heterogêneo do ponto de vista molecular, caracterizado por alterações complexas de múltiplos genes. Dentre as alterações genéticas mais estudadas, estão a mutação no gene supressor de tumor p53 e o gene que codifica o receptor do fator de crescimento tumoral (EGFR). Suas mutações produzem descontrolo celular proliferativo, sendo elas observadas em metade dos pacientes com HNSCC. [3]

A resposta imune contra tumores é mediada principalmente por linfócitos T. Os produtos dos oncogenes e genes supressores de tumor mutados são proteínas que podem ser degradadas e apresentadas às moléculas do MHC de classe I e II nas células dendríticas, que fagocitam células tumorais. [4] Os antígenos tumorais são responsáveis por induzir respostas imunes no hospedeiro e alguns se constituem alvos potenciais para a imunoterapia, sendo marcadores úteis para diagnóstico e prognóstico. [5]

O objetivo deste trabalho foi estudar os mecanismos imunitários envolvidos em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) e sua aplicação em imunoterapia por intermédio de biomarcadores.

MÉTODO

Este artigo apresenta uma revisão de literatura da imuno-oncologia em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, baseada em referências pesquisadas no PUBMED, LILACS, MEDLINE, WHOLIS e SCIELO, usando as palavras chave carcinoma de células escamosas, cabeça e pescoço, imuno-oncologia, imunoterapia, imunologia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na atualidade, o desafio é determinar quais mecanismos da resposta imune podem contribuir para a proteção contra tumores e desenvolver formas de melhorar esses mecanismos especificamente para cada tipo de tumor. [6] A determinação da resposta imune de pacientes com câncer é necessária para estabelecer seus mecanismos de ação e poder-se atuar no sentido de obter-se boa resposta ao tratamento de vários tipos de câncer localmente avançados e metastáticos. A imunoterapia interfere no sistema imunitário do próprio paciente para potencializar sua resposta imunitária, atuando nos mecanismos de escape do tumor. Entretanto, as imunoterapias atuais utilizadas em HNSCC geram grande toxicidade sistêmica e não podem ser administradas apenas localmente. [7]

Tanto a carcinogênese pelo HPV quanto a associada ao alcoolismo e tabagismo resultam de insuficiência do sistema imunitário e, conseqüentemente, células tumorais escapam do reconhecimento e lise pelos linfócitos T citotóxicos e da imunidade adaptativa. Nesses casos, há redução do número de linfócitos por apoptose dos linfócitos T e diminuição da atividade das células natural killer (NK), além de diminuição da apresentação de antígenos. [1]

O equilíbrio entre os linfócitos T e o microambiente tumoral permite a modulação da imunidade antitumoral. Alterações funcionais dos linfócitos T, macrófagos, células dendríticas e NK modificam a resposta imune. Os linfócitos T regulatórios e baixos níveis de linfócitos CD4+ e CD8+são responsáveis pela imunomodulação no HNSCC em presença de doença ativa. [8] Esses tumores provocam modificações nas células imunitárias do microambiente tumoral. [9] Ao serem reconhecidas como antígenos, células pré-malignas são destruídas pelo sistema imune, prevenindo a ocorrência do tumor. Por outro lado, células T supressoras facilitam a progressão tumoral. [9]

Há duas estratégias imunoterápicas, a antígeno específica e a antígeno não específica, ambas limitadas por mutações específicas de cada tumor. As antígeno não específicas estimulam mediadores antitumorais e impedem a imunossupressão induzida pelo tumor. Já as antígeno específicas induzem resposta imune localizada e direcionada apenas a células tumorais. Em HNSCC, os mecanismos inibidores dos *check points* são o CTLA-4 e o PD-1/PD-L1. [10]

O Cetuximabe é um anticorpo monoclonal que bloqueia o fator de crescimento epitelial (EGFR) utilizado no tratamento de metástases, em associação com radioterapia e quimioterapia. Outra opção imunoterápica é por inibidores de *check point*, que bloqueiam os receptores PD-1 e CTLA-4 de ativação das células T. A molécula PD-1 é expressa em várias células do sistema imune, particularmente nas células T citotóxicas e interage com os ligantes PD-L1, expressos por células tumorais, e PD-L2, expresso por macrófagos e células dendríticas. A interação do PD-1 com PD-L1 e PD-L2 diminui a atividade das células T e promove tolerância imune ao tumor. Portanto, se a função inibitória do PD-1 for inibida, consegue-se a resposta das células T contra o tumor. [11]

Nivolumabe e Pembrolizumabe são anticorpos anti-PD-1, inibidores de *check point* utilizados no tratamento do HNSCC recorrente e metastático em associação com platina. Sua resposta é melhor em pacientes com tumores PD-L1 positivos, mesmo em presença de HPV. [9]

O HNSCC tem elevada capacidade de infiltrar células do sistema imune. Os epitopos tumorais, criados por alterações de DNA, induzem à formação de novas proteínas que agem como antígenos, cuja tolerância é incompleta e também peptídeos não presentes no genoma humano. É possível que parte desses epitopos derivem de vírus. [10]

Se houver mutação anômala, a célula epitelial entra em apoptose ou é reconhecida pelo mecanismo de imunovigilância como anômala e é fagocitada. Caso o sistema imune falhe nesse reconhecimento, a célula alterada continua a desenvolver-se e multiplicar-se, podendo resultar no HNSCC. [2,12] A imunoedição do câncer ocorre por eliminação, equilíbrio e escape. Na eliminação, o tumor cresce invasivamente e requer maior suprimento sanguíneo, que é fornecido pela vasculogênese peritumoral induzida pelo próprio câncer. O equilíbrio forma novas variantes tumorais capazes de resistir ao sistema imune. Na fase de escape, o tumor não é mais controlável pelo sistema imune, expande-se e dissemina-se metastaticamente pelo organismo. [13]

Os linfócitos T e as células NK reconhecem as células cancerígenas e produzem o interferon gama (IFN γ) e citocinas. Células NK, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T CD8+ e outras células efetoras do sistema imune migram

para a região do tumor e provocam a sua necrose. As citocinas, principalmente o IFN γ , possuem propriedades angiostáticas e bloqueiam a formação de vasos ao redor do tumor, levando a morte de células tumorais. As células dendríticas locais fagocitam antígenos de células tumorais e migram para linfonodos regionais no processo de apresentação de antígenos. A necrose do tumor ocorre pela indução da morte das células tumorais através de ação citolítica capaz de destruir células com peptídeos estranhos em sua superfície, por meio de dois mecanismos principais: facilitação à entrada de íons e água na célula e indução da apoptose celular. O linfócito TCD8 $^{+}$ ativado produz duas proteínas envolvidas nesse processo, a perforina e a granzima, que se concentram em grânulos citoplasmáticos ligados à membrana celular por uma exocitose, que provoca lise celular. As células tumorais mortas e seus restos são fagocitados pelas células dendríticas e apresentados aos linfócitos T antígeno específicos CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$. [13] Nos linfonodos as células dendríticas induzem a diferenciação dos linfócitos T CD4 $^{+}$ em TH1, que regula positivamente as células T CD8 $^{+}$. [13]

As células HNSCC inibem o sistema imune por intermédio de células pró-tumorais inatas e adaptativas. [9] O microambiente do HNSCC contém células estromais mieloides supressoras, dendríticas imaturas e linfócitos T associados ao tumor, cujo efeito pode ser favorável à progressão tumoral e das metástases. O microambiente HNSCC geralmente contém uma quantidade significativa de células estromais não-cancerígenas, além de células neoplásicas; estes incluem macrófagos associados ao tumor, células supressoras derivadas de mielóides, células dendríticas imaturas e várias tipos de células T. Essas células imunológicas não são espectadores inocentes; de fato, elas desempenham um papel importante no desfecho da doença. Dependendo da composição e ativação do status dessas células e a sinalização circundante, o efeito pode ser favorável ou prejudicial à progressão tumoral e metástases. [2] A citotoxicidade de células NK fica diminuída pela expressão diminuída de MHC de classe I induzida pelas células tumorais. As células dendríticas têm uma função crítica, mas no HNSCC essa função também é prejudicada. Os macrófagos associados ao tumor produzem IL-10 e secretam proteases de remodelação da matriz e serina proteases associadas a mais avançados graus de tumor e metástase. [2] Células T CD8 $^{+}$ são incapazes de atividade tumoricida, devido ao mecanismo imunossupressivo do tumor, onde o

receptor PD-1 se une ao seu ligante PD-L1 expresso pelas células tumorais, que induzem sua inativação. [22] Pacientes com HNSCC possuem menos linfócitos em seu sangue periférico, mas uma presença relativamente alta de células T de memória, sugerindo reconhecimento de células T. [9]

O reconhecimento da imunossupressão em fase inicial do HNSCC permite estratégias de imunestimulação e tratamento do tumor. [2] As proteínas PD-1 e transmembrana CTLA-4, expressas por linfócitos T, inibem a resposta imune ao se unirem aos seus ligantes PD-L1 e PD-L2, expressos predominantemente por células tumorais, fazendo com que os mecanismos de defesa do sistema imune diminuam pela perda da atividade citotóxica dos linfócitos T. Esses mediadores fazem parte do microambiente tumoral e podem ser expressos tanto por células tumorais quanto por células do sistema imune. [15] A expressão dessas proteínas é maior no HNSCC do que no sangue periférico, sendo diretamente proporcional ao estágio do tumor. Associação entre HPV e PD-L1 foi observada em tumores de orofaringe, como fator prognóstico de evolução desfavorável. [15] Portanto, a expressão de PD-L1 constitui um marcador independente preditivo da evolução tumoral, cuja distribuição das marcações varia entre 46% e 87%. [10]

Por outro lado, é necessário especificar quais populações de células expressam PD-L1. Essa proteína foi expressa por células de todos os HNSCC, mas também por células imunes infiltradas nos tumores, por macrófagos, por linfócitos T ativado e por fibroblastos associados a esses tumores. [16] Cabe caracterizar o estado de ativação dos linfócitos T que expressam o PD-1 no receptor PD-L1 ativado ou inibido. Falta ainda compreender como a PD-1 interage com PD-L1 e PD-L2. [17]

Em ensaio de fase III Check Mate 141, houve melhor resposta clínica ao tratamento com o imunoterápico anti-PD-1 Nivolumbe, como monoterapia (3 mg/kg a cada 2 semanas). Entretanto, a quimioterapia com sal de platina foi mais efetiva em pacientes que expressavam mais PD-L1. No estudo KEYNOTE 12, envolvendo uma coorte de 132 pacientes com recorrência ou metástases tratados com o imunoterápico anti-PD-1 Pembrolizumabe na dose de 200 mg a cada três semanas, foi observada maior sobrevida em pacientes que expressaram PD-L1 no microambiente tumoral. No entanto, há heterogeneidade nos resultados dos diversos

ensaios clínicos com relação ao valor preditivo do PD-L1. Outra limitação é a multiplicidade de anticorpos anti-PD-L1 existente e a falta de padronização terapêutica. Em uma coorte de pacientes com HNSCC tratados com o imunoterápico anti-PD-1 pembrolizumabe, as expressões simultâneas de PD-L1 e PD-L2 correlacionaram-se diretamente com a sobrevida e essa expressão simultânea dos dois ligantes resultou em melhora na resposta ao imunoterápico e, conseqüentemente, na sobrevida dos pacientes. [18]

Com base nos resultados de ensaios com Pembrolizumabe e Nivolumabe, o FDA e a ANVISA aprovaram esses imunoterápicos para o tratamento da doença recorrente metastática. Sua eficácia é limitada a um subgrupo de pacientes e à definição de biomarcadores. Tumores com expressão de PD-L1 têm maior probabilidade de responder aos inibidores do eixo PD-1/PD-L1/PD-L2, embora a falta de expressão de PD-L1 não seja indicadora de resistência aos inibidores de PD-1. [19]

O fenótipo inflamatório das células T é proposto como biomarcador de resposta para a imunoterapia. [20,21] Estudos realizados em melanoma sugerem que os benefícios terapêuticos ocorrem em pacientes com uma resposta pré-existente de células T contra o tumor, como evidenciado por uma infiltração basal de células T CD8+ no microambiente tumoral. [22] Um estudo prospectivo do microambiente tumoral em pacientes com HNSCC descreveu infiltrado tumoral de células T CD8+, expressando a molécula PD-1 e os pacientes com infiltrado tumoral tiveram maior sobrevida em comparação com os pacientes sem esse infiltrado, independentemente de fatores desencadeantes, como HPV, tabagismo e etilismo. Pacientes com infiltrado inflamatório menor possuíam menos células T CD8+ no infiltrado inflamatório tumoral. [23]

O IFN γ é uma citocina produzida pelas células T ativadas e células NK no microambiente tumoral e desempenha um papel relevante na imunidade antitumoral. O IFN γ induz ao aumento da expressão de PD-L1/2 no tumor e no infiltrado tumoral. A resistência imune ocorre após a migração das células T para o ambiente tumoral, indicando efeito de regulação imune. [25,26] Esses achados juntamente com resultados em pacientes com melanoma sugerem que pacientes com processo

inflamatório mais exacerbado obtêm melhor resposta terapêutica aos bloqueadores de PD-1. [10, 27,28]

Células do HNSCC podem induzir a hematopoese aberrante que inibe o sistema imune pelo recrutamento de células pró-tumorais. [29,30] No sangue periférico de pacientes com HNSCC, além de as células T serem identificadas em menores concentrações, as células T efetoras de memória são encontradas em uma porcentagem alta. Quando os pacientes possuem menor processo inflamatório, a resistência imune parece ser atribuída à menor migração de células T efetoras. [9, 31,32]

CONCLUSÃO

A imunoterapia é indicada para pacientes com HNSCC localmente avançado metastático e vem evoluindo com drogas inibidoras do receptor PD-1 de linfócitos T, cuja indicação está condicionada a biomarcadores fidedignos, que devem ser identificados para obter-se sucesso terapêutico.

REFERÊNCIAS

1. Economopoulou P, Perisanidis C, Evaggelos I, Giotakis AP. The emerging role of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): anti-tumor immunity and clinical applications. *Ann Transl Med* 2016;4(9):173.
2. Freiser ME, Serafini P, Weed DT. The immune system and head and neck squamous cell carcinoma: from carcinogenesis to new therapeutic opportunities. *Immunol Res* 2013; 57:52–69.
3. Galbiatti ALS, Padovani-Junior JA, Maníglia JV, Rodrigues CDS, Pavarino EC, Bertollo EMG. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. *Braz J Otorhinolaryngol* 2013; 79(2):239-47.
4. Figueiredo CRLV. O intrigante paradoxo da inflamação associada ao câncer: uma atualização. *J Bras Patol Med Lab* 2019; 55(3): 321-332.
5. Ruffell B, DeNardo DG, Affara NI, Coussens LC. Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21(1): 3–10.
6. Jorge JJ. Imunoterapia no tratamento do câncer. *Arq Asma Alerg Imunol* 2019; 3(2):133-138.
7. Gildener-Leapman N, Ferris RL, Bauman JE. Promising systemic immunotherapies in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 2013; 49:1089–1096.
8. De Rosa V, Di Rella F, Di Giacomo A, Matarese G. Regulatory T cells as suppressors of anti-tumor immunity: Role of metabolismo. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2017; 35: 15–25.
9. Ferris RL. Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33 (29): 3293-3304.
10. Tosoni A, Franceschi E, Pasquini E, Lanese A, Donini E, Foschini MP, Dall'Olio D, Brandes AA. Immunotherapy in head and neck cancer: evidence and perspectives. *Immunotherapy* 2017; 9(16): 1351–1358.
11. Outh-Gauer S, Alt M, Le Tourneau C, Augustin J, Broudin C, Gasne C, Denize T, Mirghani H, Fabre E, Ménard M, Scotte F, Tartour E, Badoual C. Immunotherapy in head and neck cancers: A new challenge for immunologists, pathologists and clinicians. *Cancer Treatment Reviews* 2018; 65:54–64.

12. Moy JD, Moskovitz JM, Ferris RL. Biological mechanisms of immune escape and implications for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *European Journal of Cancer* 2017; 76:152-166.
13. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Câncer immunoediting: from immunosurveillance to tumor scape. *Nature Immunology* 2002; 3(11): 992-998.
14. Scutti JAB, Pineda M, Emerick Jr E, Almeida ER. Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC): desvendando os mistérios do microambiente tumoral. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 2016;70(2):156-63.
15. Przybylski K, Majchrzak E, Weselik L, Golusiński W. Immunotherapy of head and neck squamouscell carcinoma (HNSCC). Immune checkpoint blockade. *Otolaryngol Pol* 2018; 72 (6): 9-15.
16. Gavrielatou N, Doumas S, Economopoulou P, Foukas PG, Psyrii A. Biomarkers for immunotherapy response in head and neck cancer. *Cancer Treatment Reviews* 2020; 84:1-8.
17. Millrud CR, Kvarnhammar AM, Uddman R, Bjo" rnsson S, Riesbeck K, Cardell LO. The activation pattern of blood leukocytes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma is correlated to survival. *Plos One* 2012; 7(12):1-7.
18. Outh-Gauer S, Le Tourneau C, Broudin C, Scotte F, Roussel H, Hans S, Mandavit M, Tartour E, Badoual C. Actualités sur l'immunothérapie em pathologie des voies aérodigestives supérieures. *Annales de pathologie* 2017; 37: 79—89.
19. Zolkind P, Uppaluri R. Checkpoint immunotherapy in head and neck cancers. *Cancer Metastasis Rev* 2017; 17: 9694-9.
20. Kara M, Uysal S, Ik UA, Cevizci S, Og"uz Gu"cu"lu", Dereko"y1 FS. The pre-treatment neutrophil-to-lymphocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio, and red cell distribution width predict prognosis in patients with laryngeal carcinoma. *Eur ArchOtorhinolaryngol* 2016; 16:4250-8.
21. Aarstad HJ, Vintermyr OK, Ulvestad e, Aarstad HH, Kross KW, and Heimdal JH. Peripheral blood monocyte and T-lymphocyte activation levels at diagnosis predict long-term survival in head and neck squamous cell carcinoma patients. *APMIS* 2015;123: 305—314.
22. Hanna GJ, Liu H, Jones RE, Bacay AF, Lizotte PH, Ivanova EV, Bittinger MA, Cavanaugh ME, Rode AJ, Schoenfeld JD, Chau NG, Haddad RI, Lorch JH,

- Wong K, Uppaluri R, Hammerman PS. Defining an inflamed tumor immunophenotype in recurrent, metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology* 2017; 67: 61–69.
23. Turksma AW, Bontkes HJ, Van Den Heuvel H, De Gruijl TD, Von Blomberg BME, Braakhuis BJM, Leemans CR, Bloemena E, Meijer CJLM, Hooijberg E. Effector memory T-cell frequencies in relation to tumour stage, location and HPV status in HNSCC patients. *Oral Diseases* 2013; 19: 577–584.
24. Valero C, Pardo L, Lopez M, Garcia J, Camacho M, Quer M, Leon X. Pretreatment count of peripheral neutrophils, monocytes, and lymphocytes as independent prognostic factor in patients with head and neck cancer. *Head and Neck* 2017; 219-225.
25. Beckermann KE, Dudzinski SO, Rathmell JC. Dysfunctional T cell metabolism in the tumor microenvironment. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2017;35:7–14.
26. Piccirillo CA. Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine* 2008; 43: 395–401
27. Galbiatti ALS, Padovani-Junior JA, Maníglia JV, Rodrigues CDS, Pavarino EC, Bertollo EMG. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. *Braz J Otorhinolaryngol* 2013;79:239-47.
28. Figueiredo CRLV. O intrigante paradoxo da inflamação associada ao câncer: uma atualização. *J Bras Patol Med Lab* 2019; 55: 321-332.
29. Ruffell B, DeNardo DG, Affara NI, Coussens LC. Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21: 3–10.
30. Bose A, Chakraborty T, Chakraborty K, Pal S , Baral R. Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Immunity* 2008; 8: 1-10.
31. Kuss TS, Johnson JT, Whiteside TL. Clinical Significance of Decreased Chain Expression in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Research* 1999; 5:329–334.
32. Blanc C, Hans S, Tran T, Granier G, Saldman A, Anson M, Oudard S, Tartour E. Targeting Resident Memory T Cells for Cancer immunotherapy. *Front in Immunol* 2018; 9: 1-7.

ARTIGO 2

**EXPRESSÃO DE MARCADORES IMUNOFENOTÍPICOS EM MONONUCLEARES
SANGUÍNEOS DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
DE CABEÇA E PESCOÇO**

INTRODUÇÃO

As células T, após diferenciarem-se no timo a partir de precursores vindos da medula óssea, migram para a periferia e circulam entre os órgãos linfoides secundários. Ao entrarem em contato com antígenos, mediante interação com células apresentadoras de antígeno, diferenciam-se para células efetoras de memória. Os linfócitos T CD4+, cuja função é auxiliar outros tipos celulares como o T helper (Th) são subdivididos em Th1, Th2, Th17 e outros subtipos, cada um deles secretor de citocinas. As células Th1 produzem interferon gama (IFN- γ), para uma resposta efetora eficiente. [1,2]

Os linfócitos TCD8+ têm ação citolítica ao ligarem-se e destruir células com peptídeos estranhos em sua superfície, por meio de dois mecanismos principais, facilitação à entrada de íons e água na célula e associação com apoptose celular. O linfócito TCD8+ ativado produz duas proteínas envolvidas nesse processo, a perforina e a granzima, que se concentram em grânulos citoplasmáticos ligados à membrana celular por uma exocitose, que provoca lise celular. [2] As proteínas PD1 e a transmembrana CTLA-4, expressas por linfócitos T, inibem a resposta imune e seus ligantes são a PDL-1 e PDL-2, que inibem as funções efetoras do linfócito T, fazendo com que os mecanismos de defesa do sistema imune diminuam. Esses mediadores fazem parte do microambiente tumoral e podem ser expressos tanto por células tumorais quanto por células do sistema imune. [3,4]

Células progenitoras linfoides permanecem na medula óssea até sua maturação em linfócitos B, que entram na circulação e migram para os órgãos linfoides. Os linfócitos B ativados e diferenciados em plasmócitos são os responsáveis pela imunidade humoral e produção de anticorpos. Esses linfócitos atuam também como células de memória imunitária, capazes de responder rapidamente a antígenos com os quais já tenham entrado em contato previamente. Por outro lado, os linfócitos B produzem citocinas imunorregulatórias capazes de suprimir a resposta imune antitumoral, inibindo células efetoras, como linfócitos TCD8 e células natural killer (NK). [4,5]

Neutrófilos produzidos na medula óssea migram pela circulação sanguínea para focos inflamatórios onde fagocitam e eliminam, por meio de granulócitos antígenos, microrganismos e partículas alteradas por reações locais. [5,6] O número

de neutrófilos aumenta no sangue periférico de pacientes com câncer avançado e essa elevação celular associada a maior infiltrado neutrofílico no microambiente tumoral é um biomarcador de mau prognóstico. [6,7]

As funções do sistema imune, constituído por linfócitos, neutrófilos e monócitos são alteradas em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC), indicando serem esses tumores mais imunossupressores do que outros tipos de câncer. Essa condição é agravada quando os pacientes são expostos à quimioterapia e radioterapia. Estudos da função de linfócitos T em pacientes com HNSCC têm ganhado importância devido ao advento da imunoterapia [8,9], entretanto ainda não existem estudos específicos para esclarecerem o papel do sistema imunitário no HNSCC. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi analisar funções celulares imunitárias em pacientes com HNSCC.

MÉTODO

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG) sob o Processo 075/2009. Todos os participantes desta pesquisa receberam explicações sobre a investigação e somente foram incluídos no trabalho após concordarem em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

Este é um estudo de caso-controle em que foram avaliadas as células mononucleares do sangue periférico (linfócitos, neutrófilos e monócitos) de dois grupos de homens entre 50 e 65 anos (n=14):

Grupo 1 – doentes com média de idade $55 \pm 4,7$ anos, todos tabagistas e etilistas, com diagnóstico de HNSCC de boca, laringe e hipofaringe confirmado por biópsia incisional e estadiamento TNM III e IV, sem outra doença e sem tratamento oncológico cirúrgico ou adjuvante;

Grupo 2 – voluntários saudáveis, sem uso de medicamento e média de idade $55 \pm 4,5$ anos.

No grupo 1 foram pesquisados fatores desencadeantes do HNSCC, profissão, tabagismo, etilismo e carcinógenos ocupacionais, relatos de alergia, asma, dermatite atópica, urticária, rinite alérgica e intolerância à poeira, pelo de animal, mofo e alimentos). Os HNSCC foram caracterizados por seu tamanho, localização, órgãos invadidos, nódulos cervicais e de metástases a distância, por meio de exame físico, laringoscopia direta e indireta, endoscopia e tomografia computadorizada cervical, de tórax e abdome.

Os voluntários do grupo 2 foram submetidos somente a anamnese e exame físico de cabeça e pescoço. Foram incluídos somente homens sem doença aparente, que não faziam uso de medicamento nem eram tabagistas ou etilistas.

Amostras de 5 ml de sangue de cada paciente e voluntário foram coletadas em tubos estéreis contendo EDTA e heparina. Essas amostras foram processadas para citometria de fluxo, imediatamente após a coleta, utilizando um citômetro FACS Canto II (Becton & Dickinson, San Jose, CA) capaz de ler vários parâmetros simultaneamente para cada célula, com base nas suas particularidades físicas, granulosidade e ligação de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromo, por

meio da dispersão de raio laser. Propriedades fenotípicas, bioquímicas e moleculares das células caracterizaram populações e subpopulações de leucócitos, neutrófilos e monócitos. [10]

As amostras de sangue periférico foram incubadas com anticorpos monoclonais para os seguintes marcadores de superfície: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD14, anti-CD86, anti-CD-16, anti-CD66b, anti-CD-11a, anti-HLADR (Begrupo 1on & Dickinson --- San Jose, CA, EUA), anti-CD19, anti-CD56 e anti-CD69 (Caltag- Medsystems Limited --- Buckingham, Reino Unido) conjugado com fiseriocianato de fluoresceína (PE), isotiocianato (FITC) ou biotina no escuro, em temperatura ambiente por 30 minutos. Depois da incubação, os eritrócitos foram lisados com Optilyse-Solução B (Immunotec --- EUA). As células foram lavadas duas vezes em 1 ml de solução salina tamponada com fosfato frio (PBS, pH 7,4). Os anticorpos biotinilados foram revelados usando estreptavidina, FITC (Begrupo 1on & Dickinson, San Jose, CA, EUA).

Foram utilizados os seguintes anticorpos contra proteínas humanas FITC anti-CD3 (clone UCHT1) e FITC anti-CD8 (clone HIT8a) (Bio-Legend, CA, EUA); FITC anti-CD4 (clone RPA-T4) e anti-CD19 FITC (clone HIB19) da BD Pharmigen; anti-CD56 PE (clone B159), anti-CD19 PE (clone HIB19), anti-CD4 PE (clone L120) e anti-CD8 PE (clone HIT8a) fornecido por BD Biosciences (Begrupo 1on & Dickinson, San Diego, CA, EUA). A aquisição dos dados foi realizada usando o FAC Scan (Begrupo 1on & Dickinson, San Diego, CA, EUA). A análise de células foi processada e analisada usando o software Cell Quest (Begrupo 1on & Dickinson, San Jose, CA, EUA), total de linfócitos T (CD3 +), linfócitos T auxiliares (CD3+ e CD4+, CD69+), linfócitos T citotóxicos (CD3+ e CD8+, CD69+), linfócitos B (CD3+ e CD19+, CD69+), células com fenótipo NK (CD3- e CD56+), monócitos (CD14+ e CD86+), neutrófilos (CD11a+, HLA-DR+, CD66b+ e CD16+). O fenótipo foi analisado usando gráficos de pontos de fluorescência após a seleção da população de células de interesse com base no tamanho e granulosidade das células (Gráfico SSC vs. FSC – FSC: ângulo de dispersão frontal detecta o tamanho celular. SSC: ângulo de dispersão lateral detecta a composição celular. Cada partícula que passa pelo feixe de luz dispersa uma luz diferente, diferenciando os tipos celulares. As células foram contadas a partir de detectores FSC e SSC). Essas células foram então analisadas quanto à sua expressão (frequência e intensidade fluorescente média - MFI) de um

determinado marcador, usando histogramas com marcadores definidos em controles isotipos negativos.

Para calcular o tamanho da amostra e possibilitar a comparação do sistema imune (linfócitos, monócitos e neutrófilos) entre pacientes saudios e pacientes com HNSCC, foi utilizado o método proposto por Fleiss (1986) para comparações de dois grupos em amostras independentes. A quantidade total de indivíduos em cada grupo foi calculada por: $N = 2(z\alpha + z\beta)^2 / (\mu_1 - \mu_2) / \sigma$, sendo $z\alpha$ o percentil da distribuição normal correspondente ao nível de significância, com valor de 1,96; $z\beta$ o percentil da distribuição normal correspondente ao poder do teste, com valor de 0,84 para um poder mínimo de 80%, independentemente do teste. Já o tamanho de efeito é dado por $(\mu_1 - \mu_2) / \sigma$, sendo μ_1 o número médio da relação linfócitos/monócitos/neutrófilos no grupo de pacientes saudios; μ_2 o número médio da relação linfócitos/monócitos/neutrófilos no grupo de pacientes com HNSCC e σ o desvio padrão comum. O tamanho de efeito adotado foi de 1,14, baseado no estudo de Kuss (1999). [11] Portanto, $2(1,96 + 0,84)^2 / 1,14 = 13,75$. Quando a normalidade da variável não foi rejeitada optou-se por utilizar o Teste t pareado e, nas demais situações, utilizou-se a abordagem não paramétrica com o teste de Wilcoxon pareado. [12] O Teste t pareado foi utilizado quando a distribuição das variáveis não foi normal. Já o teste de Wilcoxon pareado foi utilizado quando a distribuição das variáveis foi normal. O *software* utilizado para o desenvolvimento das análises foi o R (versão 3.6.0).

RESULTADOS

Neste estudo foram avaliadas amostras de 14 sítios primários de carcinomas de células escamosas de boca (64%), laringe (28%) e hipofaringe (7%), sendo que 42% do total de pacientes apresentavam metástases evidentes em linfonodos cervicais.

Tabela 1 – Homens com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, distribuídos por idade, local de origem e estadiamento do tumor.

Paciente	Idade	Local primário	Estadiamento
1	65	Boca (assoalho)	T4aN3
2	51	Laringe (glote)	T4bN0
3	53	Laringe (supraglote)	T3N2c
4	51	Boca (mucosa jugal)	T3N2
5	51	Boca (língua)	T3N0
6	50	Boca (assoalho)	T3N2
7	62	Laringe (supraglote)	T3N0
8	55	Laringe (subglote)	T4bN3
9	53	Boca (língua)	T4bN3
10	53	Boca (língua)	T3N0
11	61	Hipofaringe (seio piriforme esquerdo)	T3N0
12	60	Boca (língua)	T3N0
13	54	Boca (língua)	T3N0
14	52	Boca (língua)	T3N0

Foram avaliadas três linhagens celulares (linfócitos, monócitos e neutrófilos) por imunofenotipagem, cujos resultados encontram-se apresentados em porcentagem de células e em mediana de intensidade de imunofluorescência (MFI). Procurou-se estabelecer um painel amplo de citometria, a fim de se obter um panorama global da distribuição de vários subgrupos das linhagens celulares estudadas nos pacientes com HNSCC, portanto, uma visão do funcionamento da imunidade celular neste grupo de pacientes. No grupo de linfócitos, o painel de citometria foi constituído pela distribuição das células NK (CD56+), dos linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, linfócitos B CD19+ e a expressão do marcador de ativação precoce CD69 entre os linfócitos T CD4+ e CD8+, bem como entre os linfócitos B CD19+. A partir da avaliação desses subgrupos celulares, observou-se aumento das células NK (CD56+), bem como dos linfócitos T CD4+ no grupo 1. A expressão do marcador de ativação precoce CD69+ aumentou nos linfócitos B CD19+ no grupo 1. Estes resultados se mostraram compatíveis em porcentagem de células e em MFI tanto para as células NK (CD56+) quanto para os linfócitos B C19+ CD69+. A distribuição dos linfócitos T CD8+ não mostrou diferença entre os grupos, bem como a expressão de CD69 entre os linfócitos T CD4+ e CD8+. Esses achados foram compatíveis tanto em porcentagem de células quanto em MFI.

O painel de citometria para avaliação dos monócitos foi constituído pelas subpopulações CD14+ e CD86+, avaliadas em porcentagem de células e em MFI. Não houve diferença entre o grupo 1 e o grupo 2 nas subpopulações de monócitos estudadas, tanto em porcentagem de células quanto em MFI.

O painel de citometria para estudo dos neutrófilos foi constituído pelas subpopulações CD11a, CD66b, CD16 e HLA-DR. As subpopulações CD11a, CD66b, e CD16 foram avaliadas em porcentagem de células e MFI, enquanto a subpopulação HLA-DR foi avaliada somente em MFI. Não foi observada diferença entre os grupos 1 e 2 nas subpopulações CD11a, CD66b e CD16 em porcentagem de células. Já quando comparadas as subpopulações em MFI, houve diferença entre os grupos 1 e 2 na expressão da subpopulação CD11a entre as células CD16+CD66b+, sendo que a MFI dessa subpopulação foi menor no grupo 1. A subpopulação HLA-DR entre as células CD16+CD66b+ não apresentou diferença entre os grupos 1 e 2.

Tabela 2 – Quantificação (média \pm desvio padrão da média) dos imunofenótipos de linfócitos em 14 pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (grupo 1) e 14 voluntários sadios (grupo 2), todos do sexo masculino

Variável	Grupo 1	Grupo 2	P
% CD56+	14,85 \pm 1,89	7,82 \pm 1,65	0,00**
MFI CD56+	219,70 \pm 15,44	106,10 \pm 18,78	0,00*
% Linfócitos	20,70 \pm 2,68	27,36 \pm 1,42	0,05**
% CD3+	67,94 \pm 2,17	62,40 \pm 3,41	0,17**
% CD3+ CD4+	77,22 \pm 4,05	60,36 \pm 2,98	0,01**
% CD69 em CD3+CD4+	34,20 \pm 6,58	18,56 \pm 2,84	0,07**
MFI CD69 em CD3+CD4+	343 \pm 66,78	184,80 \pm 16,52	0,09*
% CD3+CD8+	19,96 \pm 3,61	33,23 \pm 4,25	0,11*
% CD69 em CD3+CD8+	32 \pm 6,74	16,12 \pm 2,48	0,12*
MFI CD69 em CD3+CD8+	327,10 \pm 67,84	187,90 \pm 16,43	0,17*
% CD19+ B	15,76 \pm 3,34	11,58 \pm 0,79	0,75*
% CD69 em CD19+	38,22 \pm 6,74	19,08 \pm 3,32	0,03**
MFI CD69 em CD19+	532 \pm 116,29	219,80 \pm 23,04	0,01*

*Teste de Wilcoxon; **Teste t de Student

Tabela 3 – Quantificação (média \pm desvio padrão da média) dos imunofenótipos de monócitos em 14 pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (grupo 1) e 14 voluntários sadios (grupo 2), todos do sexo masculino

Variável	Grupo 1	Grupo 2	P
% Monócitos	69,57 \pm 2,66	68,51 \pm 1,67	0,74**
% CD14+	28,04 \pm 9,12	8,56 \pm 0,89	0,15*
% CD14+ CD86+	86,15 \pm 4,31	84,32 \pm 3,71	0,75*
MFI CD86 em CD14+	4154,93 \pm 401,76	3541,50 \pm 289,02	0,24**

*Teste de Wilcoxon; **Teste t de Student

Tabela 4 – Quantificação (média \pm desvio padrão da média) do imunofenótipo de neutrófilos em 14 pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (grupo 1) e 14 voluntários sadios (grupo 2), todos do sexo masculino

Variável	Grupo 1	Grupo 2	P
% Granulócitos	71,92 \pm 2,91	59,92 \pm 5,73	0,06*
% CD66b+	78,94 \pm 3,44	83,45 \pm 4,37	0,25*
% CD66b+ CD16+	93,49 \pm 1,36	85,27 \pm 4,45	0,41*
% CD66b+ CD16-	6,50 \pm 1,36	14,73 \pm 4,45	0,41*
MFI CD16 em CD66b+	41111,50 \pm 7784,83	39913,10 \pm 5325,90	0,86*
% CD66b+ CD16+ CD11a+	94,26 \pm 3,43	89,99 \pm 5,14	0,46*
MFI CD11a em CD66b+ CD16+	1729,33 \pm 250,96	2284,29 \pm 209,09	0,03*
% CD66b+ CD16- CD11a+	86,86 \pm 5,29	91,44 \pm 4,45	0,22*
MFI CD11a em CD66b+ CD16-	2058,21 \pm 173,92	2048,35 \pm 240,39	0,95*
MFI HLA-DR em CD66b+ CD16+	145,14 \pm 12,42	142,86 \pm 6,760	0,97*

*Teste de Wilcoxon

DISCUSSÃO

Com o objetivo de implementar um protocolo de imunoterapia para pacientes com HNSCC pela indução da citotoxicidade das células imunes, Millrud et al (2012) mostraram redução do número e capacidade migratória dos leucócitos, em seu global, e menor taxa de sua proliferação, essencial para a imunomodulação. [13-15,40,41] A resposta imune mediada por linfócitos gera resposta citotóxica específica e durável, resultando em memória imunitária. Respostas citotóxicas diretas podem ocorrer após o contato celular ou seu reconhecimento e fagocitose. Os produtos patogênicos digeridos são processados e apresentados às células de imunidade adaptativa pelas moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II. Algumas células imunes expressam moléculas de MHC de classe II, enquanto macrófagos e células dendríticas expressam MHC classe I e moléculas MHC classe II, como células apresentadoras de antígeno (APC).

A célula NK pode exibir atividade citotóxica direta ou indireta contra células com expressão diminuída de MHC classe I. [42,43] A interação entre APC e linfócitos gera resposta citotóxica específica. O material antigênico intracelular apresentado por MHC classe I é reconhecido pelos linfócitos TCD8 e sua sinalização requer sinalização coestimuladora por moléculas associadas ao receptor B7 na APC e grupo de diferenciação CD28 no linfócito T. Por outro lado, material antigênico extracelular é apresentado por moléculas de MHC classe II em APC e é reconhecido pelos linfócitos TCD4+ ativados por moléculas coestimuladoras. [14] As APC liberam citocinas, que estimulam os linfócitos TCD4+ a diferenciarem-se em Th1 auxiliar. Quando os linfócitos TCD8+ antígeno específicos ligam-se ao MHC de classe I na presença de citocinas Th1, linfócitos T citotóxicos são atraídos como mediadores de resposta imune citotóxica. Esses princípios que regem a resposta imune podem servir como uma estrutura para a compreensão da resposta imune a tumores. [15,16]

O CD69 é expresso por monócitos, plaquetas, timócitos CD3+ e algumas populações periféricas de linfócitos, incluindo células imunes da mucosa intestinal e células de lavagem broncoalveolar. Em contraste, CD69 representa uma célula antigênica de ativação em uma ampla variedade de linhagens hematopoiéticas, incluindo linfócitos T e B, células NK, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. No timo,

a expressão de CD69 parece estar relacionada a processo de maturação celular e é restrita ao receptor de células T de timócitos imaturos. Durante o desenvolvimento do timócito, a expressão de CD69 é induzida em um estágio inicial de seleção positiva com uma relação linear entre os níveis de CD69 e os níveis de expressão de CD3 de superfície. Timócitos terminalmente diferenciados diminuem a expressão de CD69 assim que são removidos do timo, sugerindo que a expressão de CD69 por timócitos é dependente no ambiente tímico. [16]

Os linfócitos em repouso não expressam CD69, que representa o marcador de ativação mais precoce, sendo rapidamente induzido na superfície celular após estimulação. Um pequeno número de células T e NK circulantes também foram encontrados como CD69+, provavelmente como resultado da ativação. A expressão de CD69 nas células T requerer a síntese de RNA e de proteínas. No entanto, existe descrição da presença de CD69 no citoplasma das células T em repouso, independentemente dessa síntese. Parece provável que a expressão de CD69 aumente as respostas das células T após suas interações. [16]

Embora o ligante fisiológico para CD69 não tenha sido identificado, há evidências de que a transdução de sinal via CD69 ative a expressão gênica de citocinas de proliferação de células T periféricas CD4+ e CD8+, bem como de timócitos, além de induzir a expressão de CD25 e proliferação celular dependente de interleucina 2 (IL2). [16,17]. A capacidade do CD69 de servir como uma molécula de transdução de sinal em vários sistemas celulares, juntamente com sua expressão aprimorada em certas doenças inflamatórias sugerem um possível papel patogênico para CD69. O CD69 foi identificado na superfície de linfócitos, mas estudos subsequentes documentaram sua expressão em vários tipos de células, sugerindo um papel amplo e talvez crítico em fisiologia celular. [16,17] De fato, o CD69 foi descrito como um receptor capaz de provocar múltiplas respostas de ativação celular. No entanto, a natureza do ligante fisiológico para CD69 permanece desconhecida. Alguns autores postularam recentemente o envolvimento do CD69 na patogênese de doenças inflamatórias. Tais abordagens experimentais eventualmente poderão fornecer informações importantes sobre esses ligantes bem como o papel fisiológico e fisiopatológico do CD69. [16,17]

A proteção imune contra tumores pode ser desenvolvida ou suprimida a partir de linfócitos T reguladores do sangue periférico. [16] A ativação dos linfócitos T induz à expressão de moléculas de superfície de ativação precoce, como o epitopo CD69. Os estádios de avaliação inicial das células T são evidenciados pela elevada porcentagem de linfócitos TCD69+. Pacientes com HNSCC possuem um número alto de linfócitos T expressando o marcador de ativação CD69 em comparação com indivíduos saudáveis. Mudanças funcionais dos linfócitos T do sangue periférico em pacientes com HNSCC podem prever prognóstico da doença. [17,18] Porcentagem elevada de linfócitos T CD69, mensurada por citometria de fluxo, associa-se com pior prognóstico. Linfócitos T reguladores aumentam sua função em presença de HNSCC e maior número de linfócitos T expressando CD69 associa-se com redução funcional do sistema imune e pior prognóstico, com diminuição da sobrevida. [18, 19, 20,21] Neste estudo, não foi observado aumento significativo de linfócitos T CD4+ e CD8+ expressando o marcador de ativação precoce CD69 nos pacientes com câncer em comparação com o grupo controle.

Os linfócitos B podem tornar-se reguladores por um mecanismo intrínseco ao câncer, que induz a essa diferenciação. O TGF- β produzido pelos linfócitos B reguladores pode converter linfócitos T CD4+ reguladores, que inibem as células NK e os linfócitos T CD8+ efetores, bloqueando a indução da imunidade tumoral mediada por linfócitos T e desativando os linfócitos T CD4+. [4] Os linfócitos B ativados pelo câncer induzem à atividade reguladora completa das células supressoras derivadas de mielócitos e inibem as células TCD4+ e TCD8+. Os linfócitos B reguladores tumorais produzem TGF- β que atua em subpopulações de monócitos e granulócitos para a supressão das células T CD4+ e T CD8+ antitumorais. Os linfócitos B reduzem diretamente a imunidade antitumoral por meio da secreção de IL-10 e induzem à conversão de linfócitos T CD4+ em linfócitos T reguladores. [4,22,23,24] Neste estudo houve aumento de linfócitos B CD19 no grupo 1, expressando o marcador de ativação precoce CD69.

O estudo de Bose (2008) avaliou o estado das células imunocompetentes que podem participar da migração para o local do tumor. [17] Os resultados mostraram que todas as classes de células citotóxicas são reduzidas. Essa situação reduz a morte de células tumorais por células imunes e inativa as células ainda disponíveis para a morte tumoral.

Observou-se em alguns estudos que o número de células NK (CD56) foi reduzido nos pacientes com HNSCC. As células NK estabelecem uma ligação funcional entre a imunidade antitumoral inata e adaptativa, compartilhando alguns receptores e funções entre as células NK e os linfócitos T. As células NK exibem características dos linfócitos Th1 e Th2 CD4+, juntamente com as atividades das células NK e, portanto, podem ter uma função dupla na regulação imune e de imunovigilância contra tumores. A regulação negativa nessa população de células NK destrói definitivamente várias cascatas de sinalização imunológica em pacientes com HNSCC. Essa diminuição proporcional e funcional das células imunocompetentes pode ser influenciada pela regulação positiva das células T reguladoras, que não estão envolvidas apenas na regulação negativa das células T e NK, mas também interferem na apresentação de antígenos de várias células, incluindo as dendríticas.

O estudo de Bose (2008) avaliou a capacidade citotóxica de neutrófilos, monócitos e linfócitos de pacientes com HNSCC em comparação com indivíduos saudáveis. Essas células foram menos citotóxicas para todas as células cancerígenas testadas em comparação com as saudáveis. As funções imunes desreguladas em pacientes com HNSCC interferem diretamente na citotoxicidade inespecífica mediada por macrófagos e células NK, na citotoxicidade celular dependente de anticorpos, na citotoxicidade dependente de complemento e na reação linfocitária T citotóxica. [17,18,25,26,27] Neste estudo, houve aumento das células NK (CD56) em presença de HNSCC em comparação com o grupo controle. O aumento do número de neutrófilos e monócitos observado nos pacientes com HNSCC no estudo de Bose (2008) não difere de estudos anteriores em outros tipos de cânceres. [19,28,29,30] Esses dados indicam aumento da inflamação com infiltração de neutrófilos e monócitos imaturos originados da medula óssea como consequência de maior transformação leucocitária. [19,28,29,30]

Os monócitos CD14+ e CD16+ produzem IL-10 e sua ativação em pacientes com HNSCC eleva a concentração sanguínea dessa interleucina, proporcionalmente ao estágio da neoplasia. [13,31,32,33] Essa elevação dos monócitos CD14+ e CD16+, bem como da IL-10 associa-se a aumento da sobrevida, indicando que esses monócitos possuem funções antitumorais. [32,33] Há maior ativação de macrófagos imaturos em pacientes com câncer, tendo em vista que os monócitos

ativados em pacientes com neoplasia avançada possuem fenótipo ainda imaturo. Neste estudo, a distribuição de monócitos CD14+ e CD86+ nos pacientes com câncer não foi alterado pelo HNSCC. [13,31,32,33]

A elevação da relação neutrófilo/linfócito associa-se a maior resposta inflamatória sistêmica e menor sobrevida em pacientes com HNSCC. Os neutrófilos atuam de forma pró-tumorigênica, ao serem pró-angiogênicos e suprimirem respostas imunitárias adaptativas. Por outro lado, neutrófilos ativados apresentam atividade antitumoral e associam-se a aumento da sobrevida. [13,34,35,36] Há maior número de neutrófilos circulantes com imunofenotipagem pró-tumoral específica e menor número de linfócitos em pacientes com HNSCC em comparação com indivíduos saudáveis. [37,38,39,40,41,42,43]

Neste estudo, os neutrófilos CD11a estavam diminuídos nos pacientes com HNSCC, por outro lado, a quantidade de neutrófilos CD16+, CD66b+ e HLA-DR não se alterou. A partícula CD11a atua na adesão dos neutrófilos às células endoteliais e nos pacientes com HNSCC essa capacidade é diminuída, facilitando a migração metastática. Estes resultados corroboram estudos anteriores. [39]

CONCLUSÃO

Em presença de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço há uma resposta inflamatória sistêmica associada a aumento do número de linfócitos T CD4+, bem como de linfócitos B CD19+, expressando o marcador de ativação precoce CD69, e células natural killer CD56+. Por outro lado, diminui-se o número total de neutrófilos CD11a. O número de linfócitos T CD8+, neutrófilos CD16+, CD66b+ e HLA-DR e de monócitos CD14+ e CD86+ não foi alterado por essa neoplasia.

REFERÊNCIAS

1. De Rosa V, Di Rella F, Di Giacomo A, Matarese G. Regulatory T cells as suppressors of anti-tumor immunity: Role of metabolism. *Cytokine Growth Factor Reviews* 2017; 35: 15–25.
2. Economopoulou P, Perisanidis C, Evaggelos I, Giotakis AP. The emerging role of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): anti-tumor immunity and clinical applications. *Ann Transl Med* 2016;4:173.
3. Piccirillo CA. Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine* 2008; 43: 395–401
4. Freiser ME, Serafini P, Weed DT. The immune system and head and neck squamous cell carcinoma: from carcinogenesis to new therapeutic opportunities. *Immunol Res* 2013; 57:52–69.
5. Ferris RL. Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33: 3293-3304.
6. Galbiatti ALS, Padovani-Junior JA, Maníglia JV, Rodrigues CDS, Pavarino EC, Bertollo EMG. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. *Braz J Otorhinolaryngol* 2013;79:239-47.
7. Yuen GJ, Demissie E, Pillai S. B Lymphocytes and Cancer: A Love–Hate Relationship. *Trend in Cancer* 2016; 2: 747-757.
8. Figueiredo CRLV. O intrigante paradoxo da inflamação associada ao câncer: uma atualização. *J Bras Patol Med Lab* 2019; 55: 321-332.
9. Wu L, Saxena S, Awaji M, Singh RK. Tumor-Associated Neutrophils in Cancer: Going Pro. *Cancers* 2019; 11:1-20.
10. Ruffell B, DeNardo DG, Affara NI, Coussens LC. Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21: 3–10.
11. Shaul ME, Fridlender ZG. Tumour- associated neutrophils in patients with cancer. *Nature Rev | Clin Oncol* 2019.
12. Jorge JJ. Imunoterapia no tratamento do câncer. *Arq Asma Alerg Imunol* 2019; 3:133-138.
13. Grecian R, Whyte MKB, Walmsley SR. The role of neutrophils in cancer. *Brit Med Bul* 2018; 128 : 5–14.

14. Gildener-Leapman N, Ferris RL, Bauman JE. Promising systemic immunotherapies in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2013; 49:1089–1096.
15. Aarstad HJ, Heimdal JH, Klementsens B, Olofsson J, Ulvestad E. Presence of activated T lymphocytes in peripheral blood of head and neck squamous cell carcinoma patients predicts impaired prognosis. *Acta Oto-Laryngol* 2006; 126: 1326-1333.
16. Marziol R, Mael J, Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol and immunotoxicol* 1999; 21:565-582
17. Bose A, Chakraborty T, Chakraborty K, Pal S, Baral R. Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Immunity* 2008; 8: 1-10.
18. Outh-Gauer S, Alt M, Le Tourneau C, Augustin J, Broudin C, Gasne C, Denize T, Mirghani H, Fabre E, Ménard M, Scotte F, Tartour E, Badoual C. Immunotherapy in head and neck cancers: A new challenge for immunologists, pathologists and clinicians. *Cancer Treat Rev* 2018; 65:54–64.
19. Stites DP; Terr A; Parslow TG. *Basic & clinical immunology*. 8th.ed. Norwalk: Appleton & Lance, 1994. 870 p.
20. Moy JD, Moskovitz JM, Ferris RL. Biological mechanisms of immune escape and implications for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Europ J of Cancer* 2017; 76:152-166.
21. Kuss TS, Johnson JT, Whiteside TL. Clinical Significance of Decreased Chain Expression in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Research* 1999; 5:329–334.
22. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Câncer immunoediting: from immunosurveillance to tumor scape. *Nature Immunol* 2002; 3: 992-998.
23. Keil M. A cross-cultural study on escalation of commitment behavior in software projects. *MIS Quarterly* 2000; 24: 299–325, 2000.
24. Scutti JAB, Pineda M, Emerick Jr E, Almeida ER. Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC): desvendando os mistérios do microambiente tumoral. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 2016;70:156-63.

25. Millrud CR, Kvarnhammar AM, Uddman R, Björnsson S, Riesbeck K, Cardell LO. The activation pattern of blood leukocytes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma is correlated to survival. *Plos One* 2012; 7:1-7.
26. Przybylski K, Majchrzak E, Weselik L, Golusiński W. Immunotherapy of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Immune checkpoint blockade. *Otolaryngol Pol* 2018; 72: 9-15.
27. Blanc C, Hans S, Tran T, Granier G, Saldman A, Anson M, Oudard S, Tartour E. Targeting Resident Memory T Cells for Cancer immunotherapy. *Front in Immunol* 2018; 9: 1-7.
28. Gavrielatou N, Doumas S, Economopoulou P, Foukas PG, Psyri A. Biomarkers for immunotherapy response in head and neck cancer. *Cancer Treat Rev* 2020; 84:1-8.
29. Lathers DMR, Garrity T, Beal NM, Young MRI. CD34+ immune suppressive cells in the peripheral blood of patients with head and neck cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000; 109:749-754.
30. Outh-Gauer S, Le Tourneau C, Broudin C, Scotte F, Roussel H, Hans S, Mandavit M, Tartour E, Badoual C. Actualités sur l'immunothérapie en pathologie des voies aérodigestives supérieures. *Ann de Pathol* 2017; 37: 79—89.
31. Schott AK, Pries R, Wollenberg B. Permanent up-regulation of regulatory T-lymphocytes in patients with head and neck cancer. *Int J of molecular medicine* 2010; 26: 67-75.
32. Zolkind P, Uppaluri R. Checkpoint immunotherapy in head and neck cancers. *Cancer Metast Rev* 2017; 17: 9694-9.
33. Turksma AW, Bontkes HJ, Van Den Heuvel H, De Gruijl TD, Von Blomberg BME, Braakhuis BJM, Leemans CR, Bloemena E, Meijer CJLM, Hooijberg E. Effector memory T-cell frequencies in relation to tumour stage, location and HPV status in HNSCC patients. *Oral Dis* 2013; 19: 577–584.
34. Kara M, Uysal S, İk UA, Cevizci S, Oğuz Güçlü, Derekoş FS. The pre-treatment neutrophil-to-lymphocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio, and red cell distribution width predict prognosis in patients with laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2016; 16:4250-8.
35. Aarstad HJ, Vintermyr OK, Ulvestad e, Aarstad HH, Kross KW, and Heimdal JH. Peripheral blood monocyte and T-lymphocyte activation levels at

- diagnosis predict long-term survival in head and neck squamous cell carcinoma patients. *APMIS* 2015;123: 305–314.
36. Hanna GJ, Liu H, Jones RE, Bacay AF, Lizotte PH, Ivanova EV, Bittinger MA, Cavanaugh ME, Rode AJ, Schoenfeld JD, Chau NG, Haddad RI, Lorch JH, Wong K, Uppaluri R, Hammerman PS. Defining an inflamed tumor immunophenotype in recurrent, metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2017; 67: 61–69.
37. Sathawane D, Kharat RS, Halder S, Roy S, Swami R, Ritim Patel B, Saha B. Monocyte CD40 expression in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Human Immunol* 2013; 74: 1–5.
39. Valero C, Pardo L, Lopez M, Garcia J, Camacho M, Quer M, Leon X. Pretreatment count of peripheral neutrophils, monocytes, and lymphocytes as independent prognostic factor in patients with head and neck cancer. *Head and Neck* 2017; 219-225.
40. Caldeira PC, Vieira ELM, Sousa AA, Aguiar MCF. Immunophenotype of neutrophils in oral squamous cell carcinoma patients. *J of oral pathology and medicine* 2017; 46:703-709.
41. Carneiro BGMC, Resende V, Alberti LR, Petroianu A. Relação entre câncer, alergia e imunomoduladores. *Rev Med Minas Gerais* 2017; 27: 1877-1895.
42. Carneiro BGMC, Petroianu A. The relationship between cancer and allergy. *Appl Cancer Res* 2011; 31:143-145.
43. Alberti LR, Caldeira DAM, Petroianu A. Comparação entre história de alergia e infecção em crianças e adolescentes. *Rev Bras Medicina* 2010; 67:277-280.
44. Petroianu A, Vasconcelos LS, Sabino KR, Simal CJR. Atividade fagocitária do sistema mononuclear fagocitário na gravidez. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2003; 25:213-218.

ANEXO A - Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa da FHEMIG**PARECER Nº 075/2009**

Registro CEP/FHEMIG: 075/2009 (este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).

Data: 08/05/2009

CAAE: - 0016.0.287.000-09

Hospital Alberto Cavalcanti

Pesquisador Responsável: Bruno Gustavo Muzzi Carvalho e Carneiro

DECISÃO:

O Comitê de Ética em Pesquisa, (CEP/FHEMIG), após cumprimento das solicitações da diligência, aprovou em 05 de Maio de 2009, o projeto de pesquisa intitulado: "RELAÇÃO ENTRE CÂNCER E ALERGIA".

Segundo o item **VII.13.d da Resolução 196/96**, os pesquisadores ficam **OBRIGADOS** a enviar relatórios anualmente.

Assim o relatório parcial deverá ser entregue em **05/05/2010** e/ou o relatório final ao término da pesquisa.

O relatório poderá seguir o modelo de acompanhamento disponível na Intranet/FHEMIG.

Vanderson Assis Romualdo
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Vanderson Assis Romualdo

Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa / FHEMIG

SIPRO: 000628812009-4

PARECER Nº 075/2009

Registro CEP/FHEMIG: 075/2009 (este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
 Data: 08/05/2009
 CAAE: - 0016.0.287.000-09


Hospital Alberto Cavalcanti

Pesquisador Responsável: Bruno Gustavo Muzzi Carvalho e Carneiro

DECISÃO:


O Comitê de Ética em Pesquisa, (CEP/FHEMIG), após cumprimento das solicitações da diligência, aprovou em 05 de Maio de 2009, o projeto de pesquisa intitulado: "RELACÃO ENTRE CÂNCER E ALERGIA".

Segundo o item VII.13.d da Resolução 196/96, os pesquisadores ficam OBRIGADOS a enviar relatórios anualmente.
 Assim o relatório parcial deverá ser entregue em 05/05/2010 e em o relatório final ao término da pesquisa.
 O relatório poderá seguir o modelo de acompanhamento disponível na Intranet FHEMIG.


 Vanderson Assis Romualdo
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
 Vanderson Assis Romualdo
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Cep. Administração Central - CEP/ADC/FHEMIG.
 08/10/2018.

Prezada Gerente,



 Jacqueline S. Pereira
 Secretária do CEP/FHEMIG

Marcia M. Almão solicita vossa assinatura na Folha de Rosto do projeto de pesquisa com o título: "Relação entre Câncer e Alergia", aprovado neste Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/ADC/FHEMIG em 05 maio de 2009.

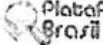
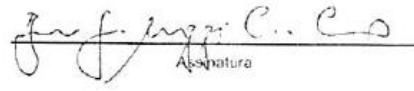
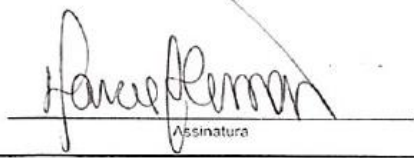
Informe que a pesquisadora Adriana Torres está como pesquisadora assistente no projeto de ser: Bruno Gustavo Muzzi.

Para registrar projeto autuado a 2012 na plataforma eletrônica de pesquisa - PLATAFORMA BRASIL - e memorando o registro nas GABAS e edição de FR conforme se - que para receber sua assinatura.

Essa solicitação é para atualizar o PP na PD e que possibilite eventuais emendas futuras. Grata


 Jacqueline S. Pereira
 Secretária do CEP/FHEMIG

ANEXO B - Renovação da carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa da FHEMIG

 MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS			
1. Projeto de Pesquisa: RELAÇÃO ENTRE CÂNCER E ALERGIA			
2. Número de Participantes da Pesquisa: 192			
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 4. Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: BRUNO GUSTAVO MUZZI CARVALHO E CARNEIRO			
6. CPF: 038.483.646-11	7. Endereço (Rua, n.º): DOS OTONI 881 SANTA EFIGENIA 8 andar BELO HORIZONTE MINAS GERAIS 30150274		
8. Nacionalidade: BRASILEIRO	9. Telefone: (31) 3519-1665	10. Outro Telefone:	11. Email: brunomuzzi@gmail.com
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.</p>			
Data: <u>13 / 09 / 2018</u>		 Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
12. Nome: Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais - FHEMIG	13. CNPJ: 19.843.929/0001-00	14. Unidade/Orgão:	
15. Telefone: (31) 3239-9552	16. Outro Telefone:		
<p>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p>			
Responsável: <u>Márcia Mascarenhas Alemão</u>	CPF: <u>641.831.006.63</u>		
Cargo/Função: <u>AGAS/Gerente</u>	 Assinatura		
Data: <u>8 / 10 / 2018</u>			
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.			


 Joqueline S. Pereira
 Secretária do CEP / FHEMIG

ANEXO C - Identificação, anamnese, fatores de risco e marcadores imunitários

Nome:		Data Entrevista / /	
Sexo <input type="checkbox"/> masculino <input type="checkbox"/> feminino		D.N. / /	Idade: anos
Prontuário:			
Cor: <input type="checkbox"/> leuco <input type="checkbox"/> feo <input type="checkbox"/> melanodérmico			
Profissão:			
Endereço:			
Telefones:		e-mail:	
<input type="checkbox"/> Anti-hipertensivo		<input type="checkbox"/> Hipoglicemiante	
<input type="checkbox"/> Hipolipemiante		<input type="checkbox"/> Antiagregante plaquetário	
<input type="checkbox"/> HAS	<input type="checkbox"/> DM tipo: <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> Arritmia	<input type="checkbox"/> Valvopatia
<input type="checkbox"/> ICC	<input type="checkbox"/> Dislipidemia	<input type="checkbox"/> Obesidade	<input type="checkbox"/> Enxaqueca
<input type="checkbox"/> AVC prévio	<input type="checkbox"/> DAC	<input type="checkbox"/> D. arterial periférica	<input type="checkbox"/> Gravidez/Puerpério
<input type="checkbox"/> Hipercoagulabilidade	<input type="checkbox"/> Trombocitose	<input type="checkbox"/> D. Chagas	
<input type="checkbox"/> D. Auto-imune: <input type="checkbox"/> AR <input type="checkbox"/> LES <input type="checkbox"/> Outras:		<input type="checkbox"/> HIV <input type="checkbox"/> Outra imunossupressão	
<input type="checkbox"/> Etilismo: quantidade:			
<input type="checkbox"/> Tabagismo: <input type="checkbox"/> prévio (parou há anos) <input type="checkbox"/> atual quantidade: anos/maço			
<input type="checkbox"/> Carcinogeno ocupacional (qual):			
<input type="checkbox"/> Neoplasia prévia (qual):			
<input type="checkbox"/> Anticoagulante		<input type="checkbox"/> Antibiótico	
<input type="checkbox"/> Analgésico		<input type="checkbox"/> Antidepressivo	
<input type="checkbox"/> Anti-histamínico		<input type="checkbox"/> Corticoide	

<input type="checkbox"/> Anti-leucotrieno	<input type="checkbox"/> Outro(s)
---	-----------------------------------

Alergia

<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
<input type="checkbox"/> Atual <input type="checkbox"/> Progressiva: até quando (ano)	
Idade do início dos Sintomas: anos	
<input type="checkbox"/> Asma	<input type="checkbox"/> Rinite alérgica
<input type="checkbox"/> Dermatite atópica	<input type="checkbox"/> Urticária
<input type="checkbox"/> Alergia a medicamentos (qual):	<input type="checkbox"/> Alimentos:
<input type="checkbox"/> Poeira	<input type="checkbox"/> Mofo
<input type="checkbox"/> Pelos de animais - qual: <input type="checkbox"/> Cachorro <input type="checkbox"/> Gato <input type="checkbox"/> Aves <input type="checkbox"/> Outros:	
<input type="checkbox"/> Alergenos ocupacionais: <input type="checkbox"/> Pesticidas <input type="checkbox"/> Outros:	

Tumor

<input type="checkbox"/> Mama <input type="checkbox"/> Ovário <input type="checkbox"/> Esôfago <input type="checkbox"/> Estômago <input type="checkbox"/> Cólon <input type="checkbox"/> Reto <input type="checkbox"/> Pâncreas
<input type="checkbox"/> CCP – qual: _____ <input type="checkbox"/> Linfoma – qual: _____ <input type="checkbox"/> Pulmão <input type="checkbox"/> Próstata
<input type="checkbox"/> Outro – qual: _____

Tratamento

Operação <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim – data: / / Tipo:
<input type="checkbox"/> Anátomo Patológico <input type="checkbox"/> Biopsia:

Estadiamento

T__ N__ M__ → EC I II III IV

INCLUSÃO:	NÃO INCLUSÃO
<ul style="list-style-type: none"> • diagnóstico histológico de câncer • ainda não operados do câncer 	<ul style="list-style-type: none"> • história prévia de outro câncer • uso de tratamento imunitário sistêmico (imunomoduladores ou imunossupressores) • corticoterapia prolongada • passado de quimioterapia ou radioterapia • doença do sistema imune (AR, LES, HIV, etc) • infecção ativa

ANEXO D – Imunofenotipagem de pacientes e controles

	% Lymphocytes	% CD3+ Lymphocytes	%CD3+CD4+ Lymphocytes	MFI CD69 in CD3+CD4+ Lymphocytes	% CD69 in CD3+CD4+ Lymphocytes
CT1	30.9 %	43.2 %	80.1 %	147	9.41 %
CT2	38.0 %	74.4 %	71.8 %	86,7	13.8 %
CT3	27.6 %	59.2 %	63.4 %	190	11.1 %
CT4	21.6 %	67.2 %	49.3 %	98,8	9.04 %
CT5	23.2 %	72.2 %	51.6 %	164	8.69 %
CT6	23.6 %	74.1 %	61.1 %	145	5.60 %
CT7	34.5 %	69.8 %	45.6 %	214	24.1 %
CT8	23.9 %	77.7 %	43.0 %	181	8.34 %
CT9	22.0 %	67.7 %	67.2 %	271	35.7 %
CT10	22.3 %	42.1 %	70.4 %	196	24.3 %
CT11	24.9 %	66.0 %	63.7 %	196	26.3 %
CT12	26.1 %	58.4 %	62.6 %	212	24.3 %
CT13	31.0 %	38.3 %	67.4 %	324	38.3 %
CT14	33.5 %	63.3 %	47.9 %	162	20.9 %
PC1	28.8 %	68.6 %	74.0 %	121	3.35 %
PC2	33.0 %	68.1 %	74.6 %	143	8.51 %
PC3	16.1 %	64.7 %	99.9 %	714	69.8 %
PC4	14.0 %	65.8 %	99.9 %	755	72.4 %

PC5	40.5 %	73.6 %	99.9 %	774	72.0 %
PC6	22.1 %	62.6 %	76.7 %	131	13.9 %
PC7	3.55 %	64.7 %	86.7 %	163	18.8 %
PC8	16.2 %	73.5 %	63.3 %	159	18.6 %
PC9	11.3 %	79.9 %	69.5 %	112	12.9 %
PC10	25.1 %	60.5 %	72.1 %	431	46.3 %
PC11	31.6 %	81.9 %	53.2 %	328	36.3 %
PC12	13.8 %	55.9 %	82.5 %	442	47.7 %
PC13	19.8 %	75.4 %	72.3 %	133	15.3 %
PC14	14.0 %	55.9 %	56.5 %	396	42.9 %

	%CD3+CD8high Lymphocytes	MFI CD69 in CD3+CD8high Lymphocytes	% CD69 in CD3+CD8high Lymphocytes	CD19+ B Lymphocytes	MFI CD69 in CD19+ B Lymphocytes	% CD69 in CD19+ B Lymphocytes
CT1	18.9 %	124	9.64 %	10.9 %	243	22.0 %
CT2	24.0 %	95,8	9.64 %	12.6 %	174	17.6 %
CT3	48.9 %	177	8.86 %	7.02 %	172	3.55 %
CT4	45.4 %	132	8.13 %	9.02 %	312	32.4 %
CT5	57.1 %	145	7.49 %	13.5 %	150	4.28 %
CT6	34.8 %	153	6.06 %	14.5 %	120	2.57 %
CT7	51.2 %	247	22.6 %	8.54 %	369	35.8 %
CT8	59.1 %	174	7.62 %	6.43 %	112	1.53 %
CT9	21.3 %	281	33.0 %	14.4 %	216	25.8 %
CT10	18.8 %	200	20.7 %	11.7 %	148	13.4 %
CT11	17.5 %	187	22.2 %	13.9 %	189	21.5 %

CT12	31.5 %	245	19.9 %	14.0 %	384	37.6 %
CT13	19.1 %	306	32.6 %	10.1 %	255	26.5 %
CT14	17.6 %	164	17.3 %	15.5 %	233	22.6 %
PC1	13.7 %	113	4.77 %	4.61 %	79,6	9.32 %
PC2	18.3 %	127	9.53 %	11.9 %	202	16.2 %
PC3	7.17 %	738	73.3 %	37.0 %	621	58.3 %
PC4	7.26 %	759	75.3 %	30.4 %	591	55.5 %
PC5	8.44 %	763	72.5 %	35.9 %	662	61.8 %
PC6	4.98 %	113	14.2 %	31.3 %	358	5.49 %
PC7	6.30 %	146	19.7 %	16.4 %	395	3.90 %
PC8	36.0 %	110	11.5 %	5.31 %	409	41.0 %
PC9	27.1 %	115	11.2 %	2.06 %	251	24.7 %
PC10	27.3 %	361	37.7 %	7.52 %	1872	86.4 %
PC11	46.5 %	311	29.4 %	5.60 %	454	43.2 %
PC12	13.8 %	405	40.2 %	13.1 %	811	59.2 %
PC13	24.3 %	162	13.3 %	5.49 %	221	20.2 %
PC14	38.3 %	356	35.4 %	14.0 %	522	49.9 %

	MFI CD56 in Lymphocytes	%CD56+ in Lymphocytes	% Monocytes	% CD14+ Monocytes	MFI CD86 in CD14+ Monocytes	%CD14+CD86+ Monocytes
CT1	238	4.79 %	70.6 %	9.99 %	2994	84.0 %
CT2	178	8.59 %	57.2 %	10.3 %	4442	98.5 %
CT3	67,3	6.64 %	71.4 %	5.49 %	3586	93.1 %
CT4	155	10.4 %	73.7 %	5.28 %	5132	99.2 %
CT5	48	3.21 %	73.8 %	5.51 %	3823	91.2 %
CT6	38	2.68 %	73.2 %	8.33 %	2527	69.0 %
CT7	214	21.4 %	58.8 %	9.12 %	5979	99.6 %
CT8	47,6	1.47 %	67.6 %	6.29 %	2345	61.7 %
CT9	49,1	1.04 %	75.1 %	12.6 %	2694	75.9 %
CT10	90,4	12.6 %	75.8 %	7.93 %	3019	83.7 %
CT11	39,7	3.36 %	71.0 %	5.81 %	2236	57.2 %
CT12	165	18.0 %	60.2 %	5.53 %	3931	96.0 %
CT13	106	10.1 %	64.2 %	16.7 %	3113	82.1 %
CT14	48,8	5.14 %	66.6 %	11.0 %	3760	89.3 %
PC1	219	11.2 %	64.6 %	20.4 %	1898	46.4 %
PC2	203	4.26 %	61.9 %	8.86 %	2880	83.5 %
PC3	212	8.34 %	77.6 %	86.3 %	4855	90.0 %
PC4	171	10.4 %	76.7 %	87.2 %	3272	79.7 %
PC5	120	6.69 %	47.4 %	95.9 %	2444	65.0 %
PC6	153	10.7 %	60.2 %	28.7 %	2485	68.2 %

PC7	190	19.8 %	60.2 %	8.08 %	4178	92.0 %
PC8	238	18.0 %	75.6 %	9.46 %	3517	90.9 %
PC9	241	15.5 %	82.3 %	3.67 %	4132	96.4 %
PC10	188	19.3 %	69.7 %	9.78 %	4922	96.8 %
PC11	218	9.96 %	64.8 %	5.03 %	4669	97.8 %
PC12	291	22.4 %	77.1 %	11.6 %	5799	99.6 %
PC13	316	23.7 %	76.4 %	10.1 %	6286	99.9 %
PC14	316	27.7 %	79.5 %	7.52 %	6832	99.9 %

	%Granulocytes	%CD66b+Granulocytes	%CD66b+CD16+Granulocytes	MFI CD11a in CD66b+CD16+Granulocytes	MFI HLA-DR in CD66b+CD16+Granulocytes	MFI CD16 in CD66b+Granulocytes
CT1	69.0 %	89.0 %	66.2 %	740	139	1541
CT2	13.6 %	86.4 %	73.7 %	1089	115	20018
CT3	70.4 %	92.5 %	94.8 %	2994	135	32912
CT4	7.41 %	87.5 %	71.4 %	925	150	13418
CT5	73.8 %	93.4 %	97.3 %	2824	187	44181
CT6	70.5 %	91.8 %	97.0 %	3027	186	59971
CT7	61.3 %	33.7 %	70.5 %	2293	114	67580
CT8	66.9 %	91.4 %	91.7 %	2701	118	57205
CT9	73.1 %	86.5 %	96.9 %	2888	171	58005
CT10	74.5 %	90.2 %	98.0 %	2606	145	52194
CT11	69.9 %	92.4 %	97.0 %	2218	112	27172
CT12	59.6 %	61.6 %	45.6 %	2620	156	45806
CT13	63.2 %	87.5 %	95.2 %	2717	144	25561
CT14	65.7 %	84.4 %	98.5 %	2338	128	53219
PC1	64.6 %	87.8 %	97.6 %	113	139	5047
PC2	62.4 %	88.3 %	94.5 %	51,6	115	3078
PC3	78.5 %	94.1 %	96.5 %	1319	129	4936
PC4	75.0 %	92.4 %	96.4 %	1516	114	5486
PC5	46.4 %	94.2 %	91.8 %	1893	202	40762
PC6	65.4 %	78.3 %	99.2 %	1092	281	38345

PC7	88.9 %	46.0 %	98.2 %	1139	145	32639
PC8	73.3 %	75.5 %	89.1 %	2069	112	48423
PC9	82.0 %	77.3 %	88.2 %	2613	148	46705
PC10	68.7 %	77.9 %	99.5 %	1996	139	66648
PC11	63.5 %	72.6 %	86.4 %	1996	122	45806
PC12	80.2 %	79.4 %	97.4 %	3327	98	97513
PC13	76.7 %	64.8 %	89.2 %	2293	156	71838
PC14	81.3 %	76.6 %	84.8 %	2793	132	68335

	%/CD66b+CD16+CD11a+ Granulocytes	% CD66b+CD16- Granulocytes	MFI CD11a in CD66b+CD16- Granulocytes	%CD66b+ CD16- CD11a+Granulocytes
CT1	63.6 %	33.8 %	89,9	70.2 %
CT2	64.3 %	26.3 %	865	40.0 %
CT3	99.5 %	5.21 %	2732	98.7 %
CT4	40.0 %	28.6 %	668	93.7 %
CT5	99.6 %	2.70 %	2864	99.1 %
CT6	99.9 %	3.02 %	3044	99.7 %
CT7	99.4 %	29.5 %	1974	97.3 %
CT8	99.7 %	8.28 %	2274	98.8 %
CT9	99.7 %	3.15 %	2613	99.3 %
CT10	99.6 %	2.04 %	2280	98.6 %
CT11	99.0 %	2.98 %	1806	92.8 %
CT12	100.0 %	54.4 %	2584	100.0 %
CT13	96.7 %	4.75 %	2732	95.4 %
CT14	98.8 %	1.50 %	2151	96.6 %
PC1	71.7 %	2.41 %	856	34.0 %
PC2	58.0 %	5.46 %	1146	53.1 %
PC3	99.6 %	3.45 %	2121	79.1 %
PC4	99.8 %	3.55 %	2351	83.7 %
PC5	99.9 %	8.18 %	3236	95.1 %

PC6	99.9 %	0.82 %	1689	94.2 %
PC7	99.9 %	1.78 %	2541	98.3 %
PC8	99.6 %	10.9 %	1985	98.8 %
PC9	100.0 %	11.8 %	2175	99.8 %
PC10	97.5 %	0.47 %	1611	93.4 %
PC11	99.7 %	13.6 %	1708	98.9 %
PC12	100.0 %	2.63 %	2912	100.0 %
PC13	94.2 %	10.8 %	1893	87.7 %
PC14	99.9 %	15.2 %	2591	100.0 %