

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à
Oftalmologia**

Adriana Torres da Silva

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES IMUNITÁRIOS E SUA ASSOCIAÇÃO AO
ACOMETIMENTO LINFONODAL EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE
CABEÇA E PESCOÇO**

Belo Horizonte

2024

Adriana Torres da Silva

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES IMUNITÁRIOS E SUA ASSOCIAÇÃO AO
ACOMETIMENTO LINFONODAL EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE
CABEÇA E PESCOÇO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Andy Petroianu

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Simões e Silva

Belo Horizonte

2024

SI586a Silva, Adriana Torres da.
Avaliação de Biomarcadores Imunitários e sua associação ao acometimento Linfonodal em Carcinoma Espinocelular de cabeça e pescoço [recurso eletrônico]. / Adriana Torres da Silva. -- Belo Horizonte: 2024.
85f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Andy Petroianu.
Coorientador (a): Ana Cristina Simões e Silva.
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Neoplasias de Cabeça e Pescoço. 2. Carcinoma de Células Escamosas. 3. Sistema Imunitário. 4. Alergia e Imunologia. 5. Dissertação Acadêmica. I. Petroianu, Andy. II. Silva, Ana Cristina Simões e. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QZ 365



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Às catorze horas do dia cinco de dezembro de dois mil e vinte e quatro, na Faculdade de Medicina, na sala 618, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **ADRIANA TORRES DA SILVA**. A presidência da sessão coube ao Prof. Andy Petroianu (Orientador) – UFMG. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: Andy Petroianu – UFMG, Ana Cristina Simões e Silva – UFMG, Cristiano Xavier Lima – UFMG, Bruno Gustavo Muzzi Carvalho e Carneiro – Cetus Oncologia, Kelly Renata Sabino – UFMG e Roberta Rayra Martins Chaves – FCMMG. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua Tese de Doutorado, intitulada: AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES IMUNITÁRIOS E SUA ASSOCIAÇÃO AO ACOMETIMENTO LINFONODAL EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar aprovada a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 05 de dezembro de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Ana Cristina Simoes e Silva, Membro de comissão**, em 06/12/2024, às 15:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Gustavo Muzzi Carvalho e Carneiro, Usuário Externo**, em 06/12/2024, às 17:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andy Petroianu, Professor do Magistério Superior**, em 06/12/2024, às 17:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberta Rayra Martins Chaves, Usuário Externo**, em 06/12/2024, às 18:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiano Xavier Lima, Chefe de departamento**, em 06/12/2024, às 20:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kelly Renata Sabino, Professora Magistério Superior-Substituta**, em 06/12/2024, às 23:31, 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 **3665374** e o código CRC **03E7FF27**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITORA

Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida

PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Profa. Dra. Isabela Almeida Pordeus

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis

DIRETORA DA FACULDADE DE MEDICINA

Profa. Dra. Alamanda Kfoury

COORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Profa. Dra. Ana Cristina Simões e Silva

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS A CIRURGIA E OFTALMOLOGIA**

Profa. Dra. Vivian Resende

**COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS A CIRURGIA E OFTALMOLOGIA**

Prof. Dr. Tulio Pinho Navarro (Subcoordenador)

Prof. Dr. Alexandre Varella Giannetti

Prof. Dr. Cristiano Xavier Lima

Prof. Dr. Marco Antônio Percopo de Andrade

Prof. Dr. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

*A quem me ensinou que não basta ter
sede: deve-se merecer a água.*

Je ne sais quoi.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes e voluntários participantes da pesquisa.

Ao Grupo de Pesquisa Avanços em Medicina.

Ao colega Bruno Gustavo Muzzi Carvalho e Carneiro pelas orientações e por me permitir participar do seu projeto.

Ao colega Guilherme de Souza Silva por ceder a casuística.

À Profa. Dra. Érica Leandro Marciano Vieira pela análise imunofenotípica por Citometria de Fluxo.

À Profa. Dra. Ana Cristina Simões e Silva e ao Laboratório de Investigação Médica da UFMG pelo acolhimento e suporte.

Ao Prof. Dr. Fábio Antônio Venâncio pela análise estatística.

À Daniela Silva dos Reis, do Laboratório de Citometria de Fluxo do ICB-UFMG, pela paciência de construir junto comigo um Heatmap.

À minha equipe e aos pacientes do Hospital da Baleia por me mostrarem a relação entre câncer e alergia: a pesquisa e os resultados clínicos aparecem primeiro na rinite alérgica e então evoluem para o câncer.

Ao Prof. Dr. Alexandre Cerqueira da Silva, autor da primeira Dissertação que li quando acadêmica e monitora de Anatomia em 2010, pela qualidade de seu trabalho sobre variações anatômicas da artéria hepática no transplante de fígado: a retidão científica e a clareza das ideias me fizeram ter vontade de fazer ciência. E aos Profs. Drs. Sávio Lana Siqueira e Agnaldo Soares Lima pelo suporte e orientação na apresentação do trabalho na Jornada de Anatomia. Tudo começou ali.

Ao Hospital Alberto Cavalcanti da Rede FHEMIG pela receptividade.

Ao Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da UFMG.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa.

Minha vereda oculta

“Existe um belo caminho para chegar a esta casa. Primeiro siga as letras, depois as frases, mire e veja: muitas vírgulas são os sinais deste sertão. Assim vá em frente. Por fim, quando seus pés não mais trocarem passos, como num encanto você flutua: está presente nos contos, poemas e nas histórias deste João. E ele te convida a viver uma relação com a obra literária. Fique certo de que o melhor desta jornada é ver com olhos de enxergar e sentir no coração como é bom ser sertanejo caminhando com Rosa neste sertão.”

(Autor Desconhecido)
Museu Casa Guimarães Rosa

RESUMO

INTRODUÇÃO: O progresso na identificação dos determinantes biológicos que modulam a resposta dos tumores às terapias oferece perspectivas para melhor direcionamento terapêutico. Há a necessidade de estudos mais detalhados dos mediadores biológicos do câncer de cabeça e pescoço e de sua associação com o estadiamento tumoral.

OBJETIVO: Avaliar biomarcadores imunitários (linfócitos, granulócitos e monócitos) de pacientes com carcinoma espinocelular (CEC) de cabeça e pescoço avançado e sua associação com acometimento linfonodal.

MÉTODO: Avaliação por citometria de fluxo de células mononucleares no sangue periférico de dois grupos de homens adultos ($n = 28$): 14 com diagnóstico de CEC de cabeça e pescoço (boca, laringe e hipofaringe) e 14 voluntários, saudáveis e sem uso de medicamentos. Os grupos celulares estudados foram os linfócitos T (CD3+, CD4+, CD8+), linfócitos B (CD19+), granulócitos (CD11a+, CD16+, CD66b+, HLA-DR) e monócitos (CD14+, CD86+), além do marcador de ativação CD69.

RESULTADOS: Em pacientes com CEC de cabeça e pescoço há diminuição de linfócitos totais ($p=0,03$) e de linfócitos T CD3+CD8+ ($p=0,02$), bem como aumento de linfócitos T CD3+CD4+ ($p<0,001$) e de células NK 56+ ($p=0,009$) em comparação com voluntários saudáveis. Nos pacientes com CEC, houve aumento da expressão do marcador CD69 em linfócitos T CD3+CD4+ ($p=0,03$) e linfócitos B CD19+ ($p=0,01$). Com o avanço do acometimento linfonodal houve diminuição da expressão do CD69 em linfócitos T CD3+CD8+ ($p=0,03$). Granulócitos e monócitos não tiveram alterações significativas.

CONCLUSÃO: Pacientes com CEC de cabeça e pescoço avançado exibem diminuição de linfócitos totais e linfócitos T CD3+CD8+ associada ao aumento dos linfócitos T CD3+CD4+ e de células NK CD56+. A expressão do marcador de ativação CD69 foi menor com o avanço do acometimento linfonodal.

PALAVRAS-CHAVE

Câncer; Cabeça e pescoço; Carcinoma espinocelular; Imuno-oncologia; Imunologia; Imunobiologia; Oncologia; Sistema imunitário.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Progress in identifying the biological determinants that modulate tumor response to therapies offers perspectives for better therapeutic targeting. There is a need for more detailed studies of the biological mediators of head and neck cancer and their association with tumor staging.

OBJECTIVE: To evaluate immune biomarkers (lymphocytes, granulocytes, and monocytes) in patients with advanced head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and their association with lymph node involvement.

METHOD: Flow cytometric evaluation of mononuclear cells in the peripheral blood of two groups of adult men ($n = 28$): 14 diagnosed with HNSCC (mouth, larynx, and hypopharynx) and 14 healthy volunteers who were not taking any medication. The cell groups studied were T lymphocytes (CD3+, CD4+, CD8+), B lymphocytes (CD19+), granulocytes (CD11a+, CD16+, CD66b+, HLA-DR), and monocytes (CD14+, CD86+), as well as the activation marker CD69.

RESULTS: In patients with HNSCC, a decrease was observed in total lymphocytes ($p=0.03$) and CD3+CD8+ T lymphocytes ($p=0.02$), as well as an increase in CD3+CD4+ T lymphocytes ($p<0.001$) and NK 56+ cells ($p=0.009$), when compared to healthy volunteers. In patients with HNSCC, an increase was found in the expression of the CD69 marker in CD3+CD4+ T lymphocytes ($p=0.03$) and CD19+ B lymphocytes ($p=0.01$). With the advancement of lymph node involvement, there was a decrease in the expression of CD69 in CD3+CD8+ T lymphocytes ($p=0.03$). Granulocytes and monocytes showed no significant changes.

CONCLUSION: Patients with advanced HNSCC show decreased total lymphocytes and CD3+CD8+ T lymphocytes associated with increased CD3+CD4+ T lymphocytes and CD56+ NK cells. The expression of the activation marker CD69 was lower when in advance of lymph node involvement.

KEYWORDS

Cancer; Head and neck; Squamous cell carcinoma; Immuno-oncology; Immunology; Immunobiology; Oncology; Immune system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Comparação dos percentuais dos subtipos de linfócitos e da expressão do marcador de ativação CD69 entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis32
Figura 2	Comparação dos percentuais dos subtipos de granulócitos entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis34
Figura 3	Comparação dos percentuais dos subtipos de monócitos entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis.....36
Figura 4	Comparação da MFI dos subtipos de células imunitárias e da expressão do marcador de ativação CD69 entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis.38
Figura 5	Correlação entre o acometimento dos linfonodos e a porcentagem de subtipos de linfócitos e da expressão de CD69 nas células.39
Figura 6	Correlação entre o acometimento dos linfonodos e a porcentagem de subtipos de granulócitos40
Figura 7	Correlação entre o acometimento dos linfonodos e a porcentagem de subtipos de monócitos.41
Figura 8	Correlação entre o acometimento dos linfonodos e a MFI dos subtipos celulares e da expressão do marcador de ativação CD69 nas células.42
Figura A1	Estratégia utilizada para Análise de Linfócitos.69
Figura A2	Estratégia utilizada para Análise de Granulócitos.70
Figura A3	Estratégia utilizada para Análise de Monócitos e Células NK71
Figura A4	Heat map esquemático dos painéis de citometria 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição e frequência dos participantes do estudo, segundo idade	24
Tabela 2	Pacientes com CEC de cabeça e pescoço distribuídos por idade, local e estadiamento do tumor.	25
Tabela 3	Classificação do grau de correlação pelo coeficiente de Pearson (r).	29
Tabela 4	Comparação dos percentuais dos subtipos de linfócitos e da expressão do marcador de ativação CD69 entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis.	31
Tabela 5	Comparação dos percentuais dos subtipos de granulócitos entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis.....	33
Tabela 6	Comparação dos percentuais dos subtipos de monócitos entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis.....	35
Tabela 7	Comparação por MFI dos subtipos de células imunitárias e da expressão do marcador de ativação CD69 entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis.	37
Tabela A1	Correlações entre estadiamento dos linfonodos e Biomarcadores Imunitários	73
Tabela A2	Comparação dos percentuais dos subtipos de linfócitos entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis.....	74
Tabela A3	Comparação dos percentuais dos subtipos de granulócitos entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis.....	75
Tabela A4	Comparação dos percentuais dos subtipos de monócitos entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis.....	76
Tabela A5	Comparação por MFI dos subtipos de células imunitárias e da expressão do marcador de ativação CD69 entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis.	77

Tabela A6	Valores individuais em porcentagem dos subgrupos de linfócitos nos pacientes.....	78
Tabela A7	Valores individuais em porcentagem dos subgrupos de linfócitos nos voluntários.....	79
Tabela A8	Valores individuais em porcentagem dos subgrupos de granulócitos nos pacientes.....	80
Tabela A9	Valores individuais em porcentagem dos subgrupos de granulócitos nos voluntários.....	81
Tabela A10	Valores individuais em porcentagem dos subgrupos de monócitos nos pacientes.....	82
Tabela A11	Valores em porcentagem dos subgrupos de monócitos nos voluntários.....	83
Tabela A12	Valores individuais em MFI dos subgrupos de linfócitos, granulócitos e monócitos nos pacientes	84
Tabela A13	Valores individuais em MFI dos subgrupos de linfócitos, granulócitos e monócitos nos voluntários	85

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

APC	Células apresentadoras de antígenos
CA	Califórnia
CCD	Carotenoid cleavage dioxygenase
CD	Cluster of differentiation
CEC	Carcinoma espinocelular
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cfDNA	Ácidos nucleicos livres
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPM	Desvio padrão da média
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EUA	Estados Unidos da América
FACS	Fluorescence activated. Cell sorter
FGFR	Fibroblast growth factor
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
FITC	Isotiocianato
HLA-DR	Human leukocyte antigen
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Human papillomavirus
ICB	Immune checkpoint inhibitors
IFN	Interferon
IL	Interleucina
MFI	Mediana de intensidade de fluorescência
MHC	Major Histocompatibility Complex
NK	<i>Natural Killer</i>
PBS	Fosfato frio
PD-1	Programmed death
PE	Fiseriocianato de fluoresceína
pH	Potencial hidrogeniônico
PS-ECOG	Performance Status do Eastern Cooperative Oncology Group

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNM	Tumor Node Metastasis
TGF	Fator de Transformação de Crescimento
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Câncer de Cabeça e Pescoço	18
1.2 Mecanismos genéticos de carcinogênese	19
1.3 Carcinogênese e sistema imunitário	19
2 JUSTIFICAÇÃO E OBJETIVO	21
3 MÉTODO	22
3.1 Aspectos éticos	22
3.2 Pacientes e Voluntários	22
3.3 Diagnóstico e estadiamento do CEC	23
3.4 Casuística	24
3.5 Citometria de Fluxo	26
3.6 Análise Estatística	27
4 RESULTADOS	30
4.1 Linfócitos	30
4.2 Granulócitos	32
4.3 Monócitos	34
4.4 Características das Células do Sistema Imunitário e Acometimento Linfonodal	38
5 DISCUSSÃO	43
5.1 Biologia Molecular no Estadiamento e Seguimento do CEC	43
5.2 Biomarcadores do Sistema imunitário – Células Mononucleares	43
5.3 Avaliação do Sistema Imunitário em Pacientes com Cancer	45
5.4 Biomarcadores avaliados neste estudo	45
5.6 Linfócitos T CD4+ e CD8+	46
5.7 Células NK	46
5.8 Linfócitos B	47
5.9 CD69	48
5.10 Monócitos e Granulócitos	51
5.11 Células do Sistema Imunitário e Acometimento Linfonodal	52
5.12 Limitações deste Estudo	56
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

APÊNDICES	64
Apêndice A - Carta de aprovação no CEP DA FHEMIG	64
Apêndice B - Reativação da aprovação do projeto no CEP da FHEMIG - Inserção na Plataforma Brasil.....	65
Apêndice B2 – Atualização do projeto no CEP da FHEMIG - Equipe de Pesquisa.....	66
Apêndice C - Identificação, anamnese, fatores de risco e marcadores imunitários.....	67
Apêndice D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	68

1 INTRODUÇÃO

O bloqueio de vias inibitórias de células T para liberar sua capacidade antitumoral vem se tornando um dos pilares no tratamento do câncer e resultou em respostas clínicas para vários tipos de câncer.[1] Os objetivos mais importantes na imunoterapia do câncer são entender os mecanismos resultantes na falha do bloqueio no ponto de verificação imunitária e identificar biomarcadores preditivos associados a resposta ao tratamento, progressão da doença e seus efeitos adversos. A identificação e validação de biomarcadores para uso clínico de rotina não é apenas crítica para acompanhar a progressão da doença e seu tratamento, mas também para personalizar e desenvolver novas terapias.[1]

A citometria de fluxo destaca-se como o método analítico de célula única mais bem-sucedido para caracterizar fenótipos de células imunitárias para acompanhar tumores sólidos, malignidades hematológicas, doença residual mínima e progressão metastática. Ela tem sido fundamental no diagnóstico, tratamento e pesquisa translacional em ensaios clínicos de câncer. [1]

1.1 Câncer de Cabeça e Pescoço

O câncer de cabeça e pescoço inclui neoplasias localizadas em cavidade oral, faringe e laringe com diferenças em suas manifestações clínicas e abordagem terapêutica, sendo que o carcinoma espinocelular (CEC) de cabeça e pescoço é a sexta neoplasia maligna mais comum no mundo, responsável por aproximadamente 6% de todos os cânceres e por até 2% das mortes por câncer, representando mais de 90% dos tumores malignos das vias aéreas e digestivas superiores. Homens são mais afetados do que mulheres. Seus fatores desencadeantes mais comuns são uso de tabaco e álcool e infecção por papilomavírus humano (HPV) subtipo 16. [2,3] A infecção pelo HPV foi descrita recentemente como fator de risco para o desenvolvimento de CEC de cabeça e pescoço, especialmente na orofaringe. Tumores positivos para HPV estão associados a um melhor prognóstico. [4]

1.2 Mecanismos genéticos de carcinogênese

Os agentes carcinogênicos causam mutações e alterações epigenéticas nos oncogenes e genes supressores do tumor, desencadeando a proliferação celular descontrolada e a formação de tumores malignos. [5] O CEC de cabeça e pescoço é heterogêneo do ponto de vista molecular, caracterizado por alterações complexas de múltiplos genes. [6] 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 descontrole celular proliferativo, sendo elas observadas em metade dos pacientes. [5] Os tumores HPV positivo e HPV negativo são genomicamente distintos, sendo os tumores HPV negativos mais heterogêneos, com maior complexidade relacionada à exposição ao tabaco e caracterizados por mutações e deleções homozigóticas dos genes supressores de tumor. A mutação ou deleção do gene TP53 é muito frequente (84%). O gene CDKN2A também pode sofrer mutação ou deleção em 58% dos casos. Alguns oncogenes são amplificados, como CCND1 (31%), que codifica a proteína ciclina D1 e controla a transição G1/S do ciclo celular e MYC (14%), que é um fator de transcrição regulador da expressão de 15% dos genes. A complexidade genômica dos subgrupos de tumores HPV negativos aumenta a desordem hierárquica dessas anomalias genéticas. [5]

1.3 Carcinogênese e sistema imunitário

Tanto a carcinogênese pelo HPV quanto a associada ao alcoolismo e tabagismo resultam de insuficiência do sistema imunitário e, conseqüentemente, células tumorais escapam da imunidade adaptativa e do reconhecimento e lise pelos linfócitos T citotóxicos. [2,3] A resposta contra tumores é mediada por linfócitos T. [7] Os produtos dos oncogenes e genes supressores de tumor mutados são proteínas que podem ser degradadas e apresentadas às moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II nas células dendríticas, que fagocitam células tumorais. Os antígenos tumorais induzem respostas imunitárias no hospedeiro. Essas proteínas são marcadores, que podem auxiliar no diagnóstico e tratamento. [2,3] O CEC de cabeça e pescoço é uma doença imunossupressora. A

desregulação das moléculas de *checkpoint* imunitário foi associada com evasão tumoral, resistência a terapias anticâncer e progressão tumoral. [8]

Nos pacientes com CEC de cabeça e pescoço existe redução do número de linfócitos por apoptose dos linfócitos T e diminuição da atividade das células *natural killer* (NK), além de diminuição da apresentação dos antígenos. [2] 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 imunitária, pois os linfócitos T regulatórios e baixos níveis de linfócitos CD8⁺ são responsáveis pela imunomodulação em presença de doença ativa. [9] As células pré-malignas, ao serem reconhecidas como antígenos, são destruídas pelo sistema imunitário, dificultando ou evitando o desenvolvimento do tumor. Por outro lado, células T supressoras facilitam a progressão tumoral. [10]

A descrição da resposta imunitária de pacientes com câncer é necessária para estabelecer seus mecanismos de ação. Em comparação com outros tumores, o CEC de cabeça e pescoço apresenta altos níveis de infiltração por células imunitárias. A imunoterapia neoadjuvante, por meio de uma ou duas administrações de bloqueadores de ponto de verificação imunitária (ICB) antes da ressecção cirúrgica está sendo estudada em Oncologia. Os ensaios neoadjuvantes com ICB oferecem a oportunidade para melhor compreensão da biologia no período perioperatório. [11] O progresso na identificação dos determinantes biológicos que moldam a resposta dos tumores às terapias oferece perspectivas para melhor direcionamento terapêutico. A avaliação de aspectos moleculares contribui para especificar e padronizar a indicação e escolha dos tratamentos. [11]

2 JUSTIFICAÇÃO E OBJETIVO

Este estudo faz parte de uma linha de pesquisa do Grupo de Pesquisa Avanços em Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Há a necessidade de estudos mais detalhados dos mediadores biológicos do CEC de cabeça e pescoço e sua associação com o estadiamento tumoral, bem como com a evolução neoplásica. [12] Ainda não há biomarcadores validados para contribuir com o estadiamento tumoral e avaliar a resposta aos tratamentos, visando a neoadjuvância e adjuvância. [12] Dyikanov et al (2024) chamaram a atenção para o potencial de análises sanguíneas como método para distribuir pacientes em grupos de resposta a terapias baseados em características imunitárias. [13] Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar biomarcadores imunitários (linfócitos, granulócitos e monócitos) de pacientes com CEC de cabeça e pescoço avançado e sua associação com acometimento linfonodal. Essa resposta imunitária ao câncer é mediada principalmente pelos linfócitos T, bem como monócitos e granulócitos.

3 MÉTODO

3.1 Aspectos éticos

O projeto deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG) no Processo 075/2009. (Apêndices A e B) Todos os participantes desta pesquisa receberam explicações sobre a investigação e somente foram incluídos após concordarem em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. (Apêndice D)

3.2 Pacientes e Voluntários

Foram avaliados 28 homens com idade entre 50 e 65 anos, com média etária de 55 ± 5 anos. Eles foram distribuídos em dois grupos: o primeiro grupo (N = 14) foi constituído por pacientes com diagnóstico de CEC de cabeça e pescoço e o segundo grupo (N = 14) foi constituído por voluntários sem doenças diagnosticadas, sem alterações imunitárias e sem uso de medicamentos.

Todos os participantes do estudo foram submetidos a anamnese, na qual foram investigados fatores desencadeantes do CEC de cabeça e pescoço, como tabagismo, etilismo e exposição a carcinógenos ocupacionais. Avaliação clínica do sistema imunitário também foi realizada, através da investigação de relatos de alergia, asma, dermatite atópica, urticária, rinite alérgica e intolerância a poeira, pelo de animal, mofo e alimentos.

Os pacientes preencheram os seguintes critérios de inclusão: diagnóstico confirmado de CEC de cabeça e pescoço, em estádios operáveis, que não tinham recebido nenhum tratamento prévio, além de serem tabagistas e etilistas. Pacientes com outros tipos histológicos, alterações imunitárias ou comorbidades graves não foram incluídos.

Os pacientes deste estudo foram classificados como PS 0 (realizando atividades de forma normal com todo o seu cotidiano, sem nenhuma restrição) e P1 (com manifestações clínicas da doença, sendo restritos para atividades de muito esforço, porém deambulando e conseguindo levar suas atividades de vida diária) na

escala de Performance Status do Eastern Cooperative Oncology Group (PS-ECOG) no momento da participação na pesquisa. [14]

3.3 Diagnóstico e estadiamento do CEC

O diagnóstico de CEC foi confirmado através de biópsia incisional, na qual o exame histopatológico revelou tratar-se de carcinoma espinocelular em todos os pacientes, e a caracterização dos tumores foi realizada a partir do exame físico, laringoscopia direta e indireta, endoscopia digestiva alta e tomografia computadorizada cervical, de tórax e abdome, que determinaram a localização e tamanho do tumor primário, órgãos invadidos, acometimento de linfonodos cervicais e metástases a distância. Nos pacientes deste estudo, os tumores acometiam boca, laringe e hipofaringe, sendo que não foram incluídos pacientes com CEC de orofaringe (de comportamento biológico relacionado com a infecção por HPV), nem pacientes com neoplasias de nasofaringe (comportamento biológico relacionado com a infecção pelo vírus Epstein-Barr). A partir dessas informações foi realizado o estadiamento clínico de cada paciente seguindo o sistema TNM (T = tumor; N = nodes; M = metastasis), de acordo com a 8ª edição do manual de estadiamento do câncer do American Joint Committee on Cancer (2017). [15]

De acordo com as características do tumor primário, os cânceres de boca e hipofaringe foram classificados como T1 (≤ 2 cm), T2 (> 2 cm ≤ 4 cm), T3 (> 4 cm) e T4 (tumor avançado). Já os cânceres de laringe foram classificados como T1 (tumor limitado a uma localização com pregas vocais moveis), T2 (tumor que invade mais de uma localização com pregas vocais móveis), T3 (tumor com fixação da laringe) e T4 (tumor com extensão extralaríngea).

Em relação às metástases linfonodais, os pacientes foram classificados como N0 (sem metástases linfonodais), N1 (metástases em um único linfonodo ipsilateral < 3 cm), N2 (múltiplos linfonodos ipsilaterais ou contralaterais < 6 cm) e N3 (metástases em um ou múltiplos linfonodos ipsilaterais ou contralaterais > 6 cm). Já as metástases a distância foram classificadas em M0 (ausentes) e M1 (presentes).

3.4 Casuística

Houve similaridade entre os participantes de cada grupo. A comparação estatística entre os grupos, utilizando o teste qui ao quadrado de Pearson, não revelou diferença na distribuição da idade ($p = 0,77$). (Tabela 1)

Tabela 1 – Distribuição e frequência dos participantes do estudo, por idade

Grupo	N (%)	Idade				p*
		Média $\pm$ DPM	Mediana	Mínimo	Máximo	
Pacientes	14 (50%)	(55 $\pm$ 5)	53	50	65	0,77
Voluntários	14 (50%)	(55 $\pm$ 5)	55	50	65	

DPM = desvio padrão da média

*Teste qui ao quadrado de Pearson

O primeiro grupo (N = 14) foi constituído por pacientes tabagistas e etilistas, com diagnóstico de CEC de boca, laringe e faringe (hipofaringe) em estádios T3 e T4, sem outra doença detectável em exame clínico e complementares antes de iniciarem o tratamento. Já o segundo grupo (N = 14) foi constituído por voluntários sem doenças diagnosticadas, sem uso de medicamentos, sem alterações imunitárias, não etilistas e não tabagistas. Em ambos os grupos não houve relatos durante a anamnese de alergia ou outras condições clínicas que afetassem o sistema imunitário.

O local do tumor primário foi a boca em 9 pacientes (64%), em outros 4 pacientes (29%) o tumor estava na laringe e um paciente (7%) apresentava tumor na faringe (hipofaringe). Em relação ao estadiamento do tumor primário, quatro pacientes (29%) apresentavam tumor no estágio T4 e dez pacientes (71%) apresentavam tumor no estágio T3. Quanto a metástases linfonodais, seis pacientes (42%) apresentavam metástases e em oito pacientes (58%) elas não foram encontradas. No grupo dos seis

pacientes com metástases linfonodais, três pacientes (50%) apresentavam estadiamento N3 e três pacientes (50%) tinham estadiamento N2. Em nenhum paciente foi detectada metástase à distância. (Tabela 2).

Tabela 2 – Pacientes com CEC de cabeça e pescoço distribuídos por idade, local e estadiamento do tumor

Paciente	Idade	Local	Estadiamento
1	65	Boca (assoalho)	T4N3M0
2	51	Laringe (glote)	T4N0M0
3	53	Laringe (supraglote)	T3N2M0
4	51	Boca (mucosa jugal)	T3N2M0
5	51	Boca (língua)	T3N0M0
6	50	Boca (assoalho)	T3N2M0
7	62	Laringe (supraglote)	T3N0M0
8	55	Laringe (subglote)	T4N3M0
9	53	Boca (língua)	T4N3M0
10	53	Boca (língua)	T3N0M0
11	61	Faringe (hipofaringe)	T3N0M0
12	60	Boca (língua)	T3N0M0
13	54	Boca (língua)	T3N0M0
14	52	Boca (língua)	T3N0M0

3.5 Citometria de Fluxo

Amostras de 5 ml de sangue de cada paciente e cada voluntário foram coletadas de veia superficial de membro superior esquerdo em tubos estéreis contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e heparina. Essas amostras foram processadas por meio de citometria de fluxo, imediatamente após a coleta, utilizando o citômetro FACS Canto II (Becton & Dickinson, San Jose, CA, Estados Unidos da América - EUA), para avaliar as populações e subpopulações de linfócitos, granulócitos e monócitos. Confeccionou-se um painel amplo de citometria, a fim de serem obtidas as características gerais da distribuição das linhagens celulares e avaliar o funcionamento do sistema imunitário celular. No grupo de linfócitos, o painel de citometria foi obtido pela distribuição das células NK (CD56+), dos linfócitos T (CD3+, CD4+, CD8+), linfócitos B CD19+ e da expressão do marcador de ativação CD69 nos linfócitos T CD4+ e CD8+ e nos linfócitos B CD19+. O painel de citometria para avaliação dos monócitos foi obtido pelas subpopulações CD14+ e CD86+. O painel de citometria para estudo dos granulócitos foi obtido pelas subpopulações CD11a, CD66b, CD16 e HLA-DR. As amostras de sangue periférico foram incubadas com anticorpos monoclonais para os seguintes marcadores de superfície: antiCD3, antiCD4, antiCD8, antiCD14, antiCD86, antiCD-16, antiCD66b, antiCD-11a, antiHLADR (Begrupo 1on & Dickinson, San Jose, CA, EUA), antiCD19, antiCD56 e antiCD69 (Caltag- Medsystems Limited, Buckingham, Reino Unido) conjugado com fiseriocianato de fluoresceína (PE), isotiocianato (FITC) ou biotina no escuro, em temperatura ambiente ao redor de 25°C 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).

Este estudo incluiu os seguintes anticorpos contra proteínas humanas FITC: antiCD3 (clone UCHT1) e FITC antiCD8 (clone HIT8a) (Bio-Legend, CA, EUA); FITC antiCD4 (clone RPA-T4) e antiCD19 FITC (clone HIB19) da BD Pharmigen; antiCD56 PE (clone B159), antiCD19 PE (clone HIB19), antiCD4 PE (clone L120) e antiCD8 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+), granulócitos (CD11a+, HLA-DR+, CD66b+ e CD16+).

O fenótipo das células foi analisado por meio de gráficos de pontos de fluorescência, com base no tamanho e granulosidade celular (Figuras A1, A2, A3 e A4), cujos resultados encontram-se apresentados em porcentagens de células e em mediana de intensidade da fluorescência (MFI).

3.6 Análise Estatística

A análise descritiva e a caracterização da amostra foram realizadas a partir da distribuição de frequência (absoluta e relativa) das variáveis selecionadas, cálculo de média, desvio padrão, medianas e intervalos interquartílicos. Para a análise descritiva, a população foi distribuída em pacientes com diagnóstico confirmado de câncer e voluntários sem diagnóstico confirmado de câncer. Os resultados dos biomarcadores foram divididos em 4 conjuntos de categorias: linfócitos, granulócitos, monócitos e marcadores de ativação. Cada conjunto foi submetido a análises específicas para explorar as diferenças entre os grupos e identificar padrões relevantes.

Para determinar se a distribuição dos biomarcadores seguia um padrão normal, foi aplicado, inicialmente, o teste de Shapiro-Wilk. Este teste é amplamente utilizado para avaliar a normalidade dos dados, comparando a distribuição observada com uma distribuição normal teórica. Quando os resultados indicaram uma distribuição normal, foi aplicado o teste t de Student, uma análise para comparar as médias de duas amostras independentes, pressupondo igualdade de variâncias. Em contrapartida, para os dados que não apresentaram uma distribuição normal, foi utilizado ao teste de Mann-Whitney U. Esse teste não paramétrico é ideal para comparar medianas de duas amostras independentes, sendo particularmente útil quando os dados desviam da normalidade ou quando as amostras são pequenas. Ambos os testes nos

permitiram avaliar as diferenças estatísticas nas médias ou medianas dos biomarcadores entre os grupos de pacientes com câncer e voluntários.

Para analisar a correlação entre os biomarcadores e o acometimento linfonodal, foi realizada uma categorização do estadiamento do CEC com base no envolvimento dos linfonodos, de acordo com a 8ª edição do TNM do American Joint Committee on Cancer (2017) [15]. Os linfonodos foram classificados em três categorias: '0' para linfonodos não palpáveis (N0), '<6' para linfonodos com envolvimento maior que 3 cm e menor que 6 cm (N2), e '>6' para linfonodos com envolvimento igual ou superior a 6 cm (N3). Essa categorização permitiu uma análise detalhada das correlações entre os biomarcadores e os diferentes estádios de acometimento linfonodal. Importante ressaltar que, na amostra estudada, não houve casos de estadiamento N1 (linfonodos com envolvimento menor que 3 cm).

Inicialmente, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade da distribuição dos biomarcadores. Para os dados que apresentaram distribuição normal, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson, que mede a dimensão e a direção da associação linear entre duas variáveis contínuas. Já para os dados que não seguiram uma distribuição normal, foi aplicado o coeficiente de correlação de Spearman, que é um método não paramétrico adequado para medir a força e a direção da associação entre variáveis ordinais ou não normais.

Para a interpretação das correlações, os coeficientes de correlação de Pearson (r) e Spearman (ρ) foram considerados significativos quando o valor de p foi inferior a 0,05. Além disso, foram gerados gráficos de dispersão para identificar as relações entre os biomarcadores e o estadiamento dos linfonodos. Esses gráficos incluíram linhas de tendência para indicar a direção e a magnitude das associações.

Cada gráfico representou um biomarcador diferente e incluiu valores medidos para diferentes estádios. Uma linha azul representa o melhor ajuste (correlação linear) desses valores, indicando a tendência geral dos dados. A área cinza ao redor da linha azul é a banda de confiança, que oferece uma estimativa do intervalo de confiança.

Os resultados das análises foram descritos com os valores dos coeficientes de correlação e os intervalos de confiança de 95% para avaliar a precisão das estimativas. Foram considerados os seguintes critérios para a interpretação da força das correlações: (Tabela 3)

Tabela 3- Classificação do grau de correlação pelo coeficiente de Pearson (r)

Coeficiente de correlação de Pearson (r)	Correlação
0,00 - 0,19	Correlação muito fraca
0,20 - 0,39	Correlação fraca
0,40 - 0,69	Correlação moderada
0,70 - 0,89	Correlação forte
0,90 - 1,00	Correlação muito forte

Todas as análises foram conduzidas com um nível de significância de 0,05, e os resultados foram interpretados no contexto da relevância clínica para os objetivos do estudo e foram executadas utilizando o software estatístico R. (versão 4.1.1) por meio da interface RStudio (R Core Team, 2021). O pacote ggplot2 R foi usado para desenvolver gráficos (Wickham, 2014). [16,17]

4 RESULTADOS

4.1 Linfócitos

A comparação dos percentuais dos subtipos de linfócitos entre os pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis é mostrada na Tabela 4 e na Figura 1.

O grupo de pacientes com CEC apresentou redução ($p = 0,03$) do percentual de linfócitos totais em comparação aos voluntários saudáveis. Os resultados para a porcentagem de células CD56+ revelaram uma diferença entre os grupos ($p = 0,009$), com o grupo de pacientes com câncer exibindo uma média mais elevada (14,9%) em comparação com o grupo de voluntários (7,8%). No grupo de pacientes com CEC, o percentual de linfócitos T CD3+CD4+ foi mais elevado ($p < 0,001$), enquanto o percentual de linfócitos T CD3+CD8+ foi menor ($p=0,02$) quando comparados aos voluntários.

Em relação ao marcador de ativação CD69, tanto em linfócitos B CD19+ quanto em linfócitos T CD3+CD4+, o grupo com CEC apresentou percentuais mais altos, com valores de p indicando diferenças para linfócitos B CD19+ ($p = 0,01$) e linfócitos T CD3+CD4+ ($p = 0,03$).

Tabela 4 - Comparação dos percentuais dos subtipos de linfócitos e da expressão do marcador de ativação CD69 entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis

Biomarcadores	Grupo	Valores (Média $\pm$ DPM)	p
Linfócitos totais	Pacientes	20,7 $\pm$ 10,0	0,03*
	Voluntários	27,4 $\pm$ 5,3	
Linfócitos CD3+	Pacientes	67,9 $\pm$ 8,1	0,18*
	Voluntários	62,4 $\pm$ 12,8	
Linfócitos CD56+	Pacientes	14,9 $\pm$ 7,1	0,009*
	Voluntários	7,8 $\pm$ 6,2	
CD69 em Linfócitos B CD19+	Pacientes	38,2 $\pm$ 25,2	0,01*
	Voluntários	19,1 $\pm$ 12,4	
CD69 em Linfócitos CD3+CD8+	Pacientes	32 $\pm$ 25,2	0,07**
	Voluntários	16,1 $\pm$ 9,3	
CD69 em Linfócitos CD3+CD4+	Pacientes	34,2 $\pm$ 24,6	0,03*
	Voluntários	18,6 $\pm$ 10,6	
Linfócitos B CD19+	Pacientes	15,8 $\pm$ 12,5	0,2**
	Voluntários	11,6 $\pm$ 3,0	
Linfócitos CD3+CD8+	Pacientes	20,0 $\pm$ 13,5	0,02**
	Voluntários	33,2 $\pm$ 15,9	
Linfócitos CD3+CD4+	Pacientes	77,2 $\pm$ 15,2	<0,001*
	Voluntários	60,4 $\pm$ 11,2	

DPM = Desvio padrão da média

*Teste t de Student; ** Teste de Mann-Whitney U

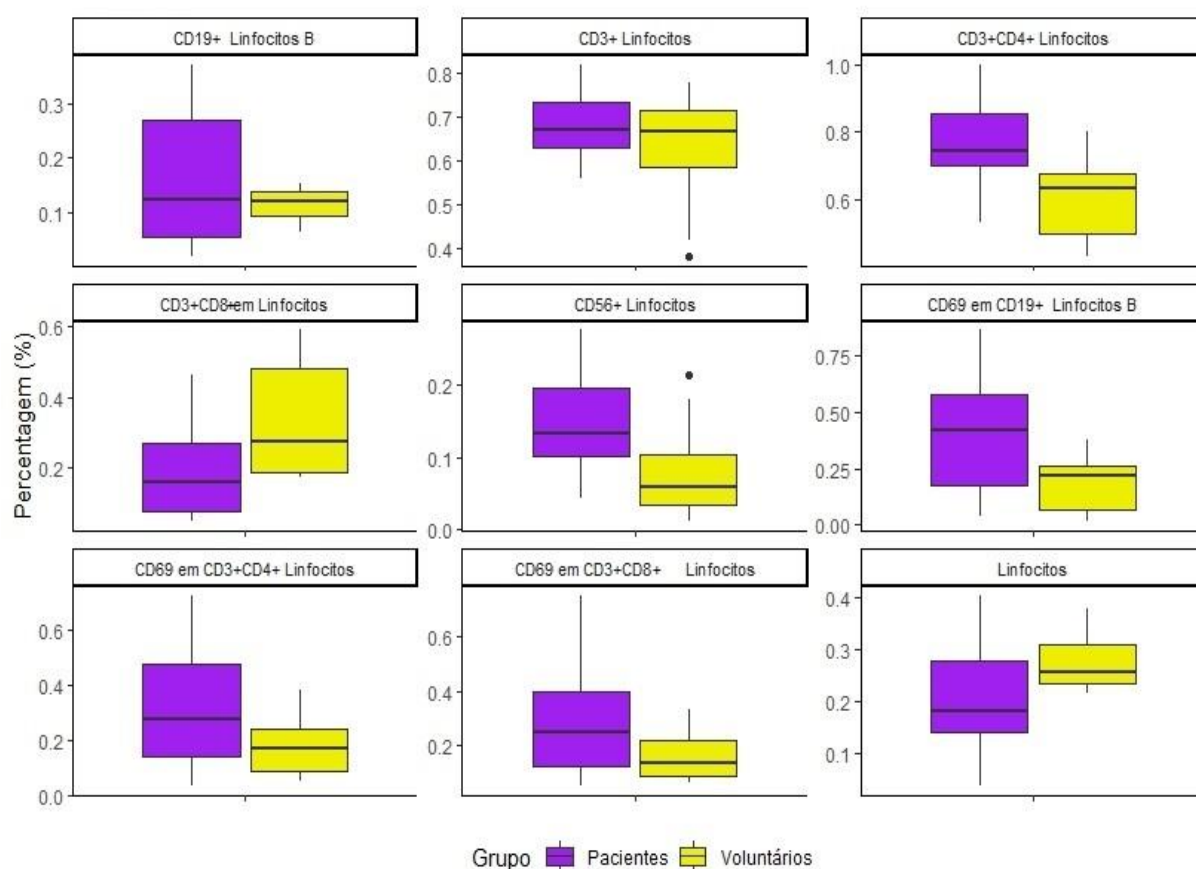


Figura 1- Comparação dos percentuais dos subtipos de linfócitos e da expressão do marcador de ativação CD69 entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis

4.2 Granulócitos

A Tabela 5 e a Figura 2 mostram os percentuais dos subtipos de granulócitos nos grupos de pacientes e voluntários. Apesar das diferenças observadas nas médias entre os grupos, não houve significância.

Tabela 5 - Comparação dos percentuais dos subtipos de granulócitos entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis

Biomarcadores	Grupo	Valores	p*
		(Média $\pm$ DPM)	
Granulócitos	Pacientes	71,9 $\pm$ 10,9	0,06
	Voluntários	59,9 $\pm$ 21,5	
Granulócitos CD66b+	Pacientes	78,9 $\pm$ 12,9	0,21
	Voluntários	83,5 $\pm$ 16,4	
Granulócitos CD66b+CD16+CD11a+	Pacientes	94,3 $\pm$ 12,8	0,15
	Voluntários	90,0 $\pm$ 19,2	
Granulócitos CD66b+CD16- CD11a+	Pacientes	86,9 $\pm$ 19,8	0,55
	Voluntários	91,4 $\pm$ 16,6	
Granulócitos CD66b+CD16-	Pacientes	6,5 $\pm$ 5,1	0,37
	Voluntários	14,7 $\pm$ 16,7	
Granulócitos CD66b+CD16+	Pacientes	93,5 $\pm$ 5,1	0,37
	Voluntários	85,3 $\pm$ 16,7	

DPM = desvio padrão da média

*Teste t de Student; ** Teste de Mann-Whitney U

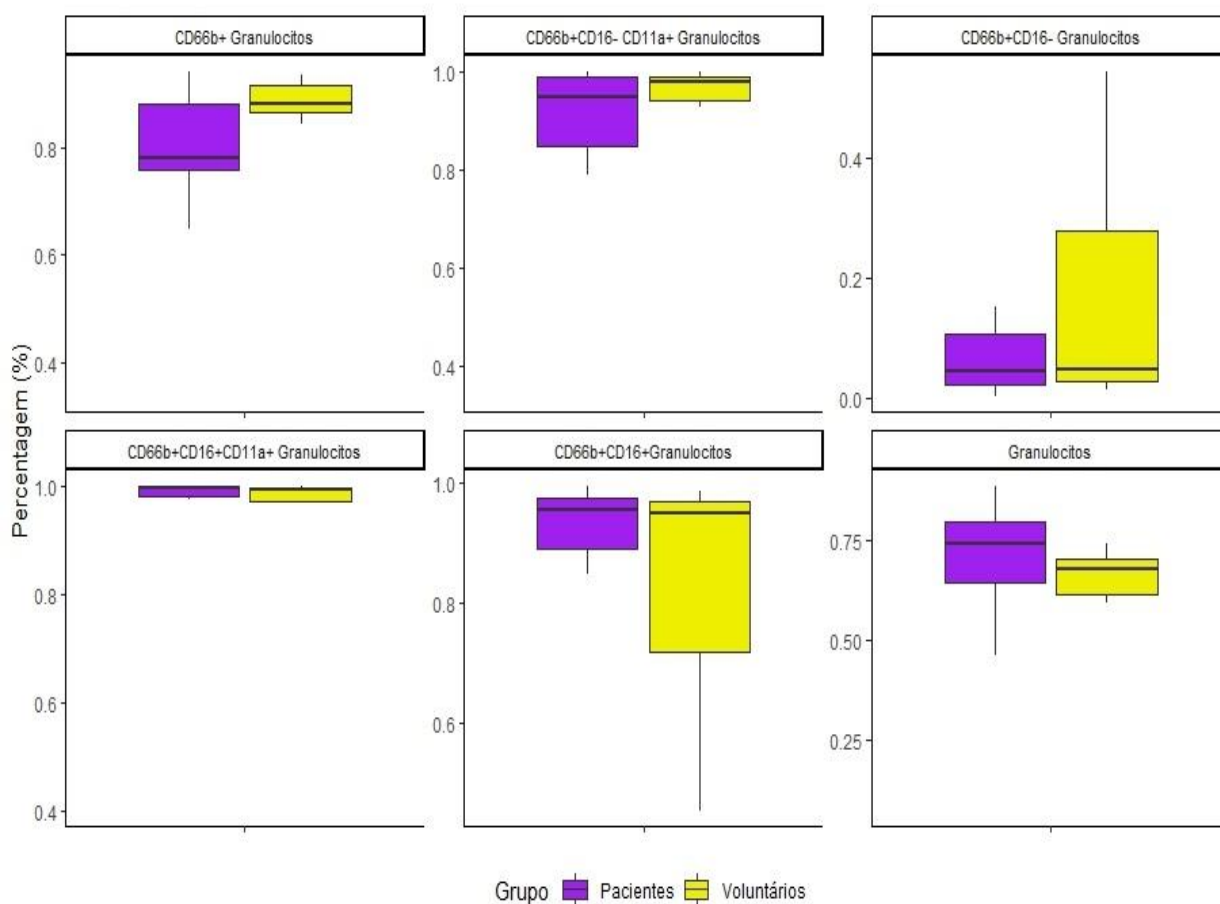


Figura 2 – Comparação dos percentuais dos subtipos de granulócitos entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis

4.3 Monócitos

A Tabela 6 e a Figura 3 mostram os percentuais dos subtipos de monócitos nos grupos de pacientes e voluntários. Apesar das diferenças observadas nas médias entre os grupos, nenhuma diferença entre os valores apresentou significância estatística.

Tabela 6 - Comparação dos percentuais dos subtipos de monócitos entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis

Biomarcadores	Grupo	Valores	p
		(Média±DPM)	
Monócitos	Pacientes	69,6 ± 10,0	0,73*
	Voluntários	68,5 ± 6,2	
Monócitos CD14+	Pacientes	28,1 ± 34,1	0,13**
	Voluntários	8,6 ± 3,4	
Monócitos CD14+CD86+	Pacientes	86,2 ± 16,1	0,52**
	Voluntários	84,3 ± 13,9	

DPM = desvio padrão da média

Teste t de Student; ** Teste de Mann-Whitney U

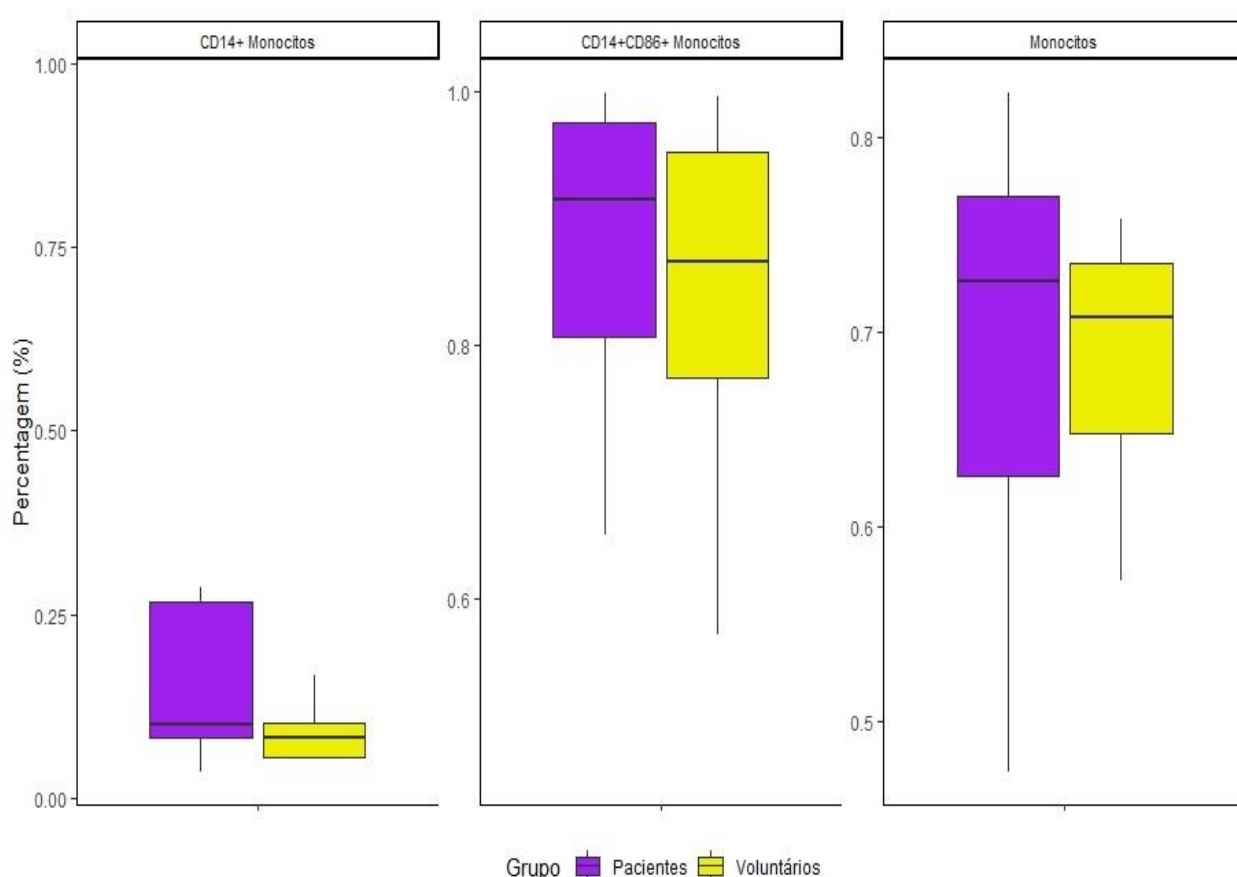


Figura 3 – Comparação dos percentuais dos subtipos de monócitos entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis

A Tabela 7 apresenta a comparação da MFI entre grupos de pacientes com CEC e voluntários utilizada para avaliar a expressão de subtipos de células do sistema imunitário e do marcador de ativação CD69 nessas células. Não houve diferença entre os grupos para a maioria das medidas de MFI, exceto para a expressão de CD69 em linfócitos B CD19+ e para as células NK CD56+. A MFI do marcador de ativação CD69 em linfócitos B CD19+ foi maior nos pacientes com câncer em comparação com os voluntários ($p = 0,002$). A MFI de células NK CD56+ foi maior nos pacientes com CEC em relação ao grupo de voluntários ($p < 0,001$) (Tabela 7 e Figura 4).

Tabela 7 – Comparação por MFI dos subtipos de células imunitárias e da expressão do marcador de ativação CD69 entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis

Biomarcadores	Grupo	Valores (Média $\pm$ DPM)	p
MFI CD69 em Linfócitos CD3+CD8 +	Pacientes	327 $\pm$ 253,8	0,50**
	Voluntários	188 $\pm$ 61,5	
MFI CD69 em Linfócitos B CD19+	Pacientes	532 $\pm$ 435,1	0,002**
	Voluntários	220 $\pm$ 86,2	
MFI CD69 em Linfócitos CD3+CD4+	Pacientes	343 $\pm$ 249,9	0,39**
	Voluntários	185 $\pm$ 61,8	
MFI CD56+ em Linfócitos	Pacientes	220 $\pm$ 57,8	<0,001**
	Voluntários	106 $\pm$ 70,3	
MFI CD16 em Granulócitos CD66b+	Pacientes	41112 $\pm$ 29128,2	0,89*
	Voluntários	39913 $\pm$ 19917,7	
MFI HLA-DR em Granulócitos CD66b+CD16+	Pacientes	145 $\pm$ 46,5	0,64**
	Voluntários	143 $\pm$ 25,3	
MFI CD11a em Granulócitos CD66b+CD16+	Pacientes	1729 $\pm$ 939	0,59**
	Voluntários	2284 $\pm$ 782,3	
MFI CD11a em Granulócitos CD66b+CD16-	Pacientes	2058 $\pm$ 650,8	0,08**
	Voluntários	2048 $\pm$ 899,5	
MFI CD86 em Monócitos CD14+	Pacientes	4155 $\pm$ 1503,2	0,30**
	Voluntários	3542 $\pm$ 1081,4	

DPM = Desvio padrão da média

*Teste t de Student; ** Teste de Mann-Whitney U

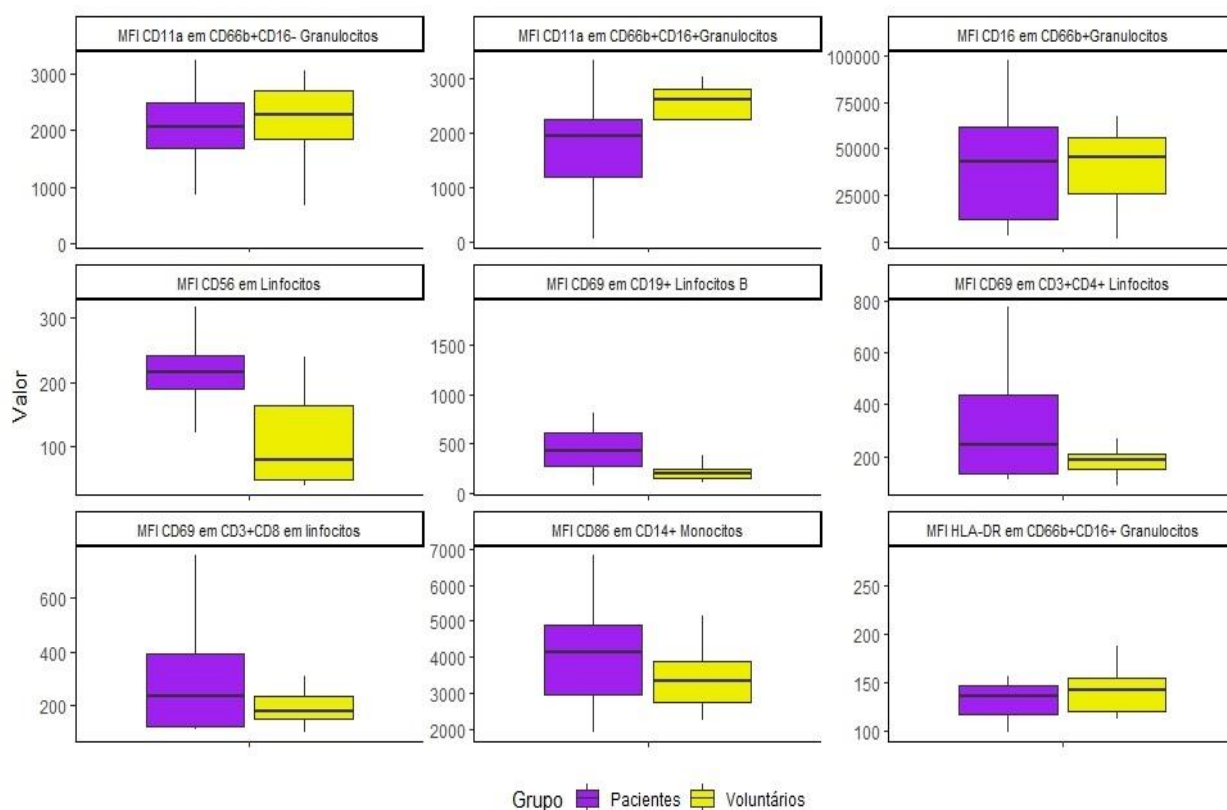


Figura 4 – Comparação da MFI dos subtipos de células imunitárias e da expressão do marcador de ativação CD69 entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis

4.4 Características das Células do Sistema Imunitário e Acometimento Linfonodal

A análise de correlação entre o estadiamento dos linfonodos acometidos pelo câncer e a expressão de biomarcadores imunitários em pacientes revelou tendências variadas. Não houve correlação significativa entre o estadiamento e os linfócitos totais. Os linfócitos CD3+CD8+ exibiram uma correlação negativa muito fraca, indicando pouca ou nenhuma relação significativa com o estadiamento. A expressão do marcador CD69 nos linfócitos B CD19+ demonstrou uma correlação negativa fraca. Nos subconjuntos de linfócitos CD3+CD4+ e CD3+CD8+ a correlação também foi negativa, sendo classificada como moderada para CD3+CD4+ e fraca para CD3+CD8+. Em resumo, não foi observada correlação estatisticamente significativa

do acometimento linfonodal com a porcentagem dos subtipos de linfócitos nem com a porcentagem de linfócitos expressando CD69. (Figura 5)

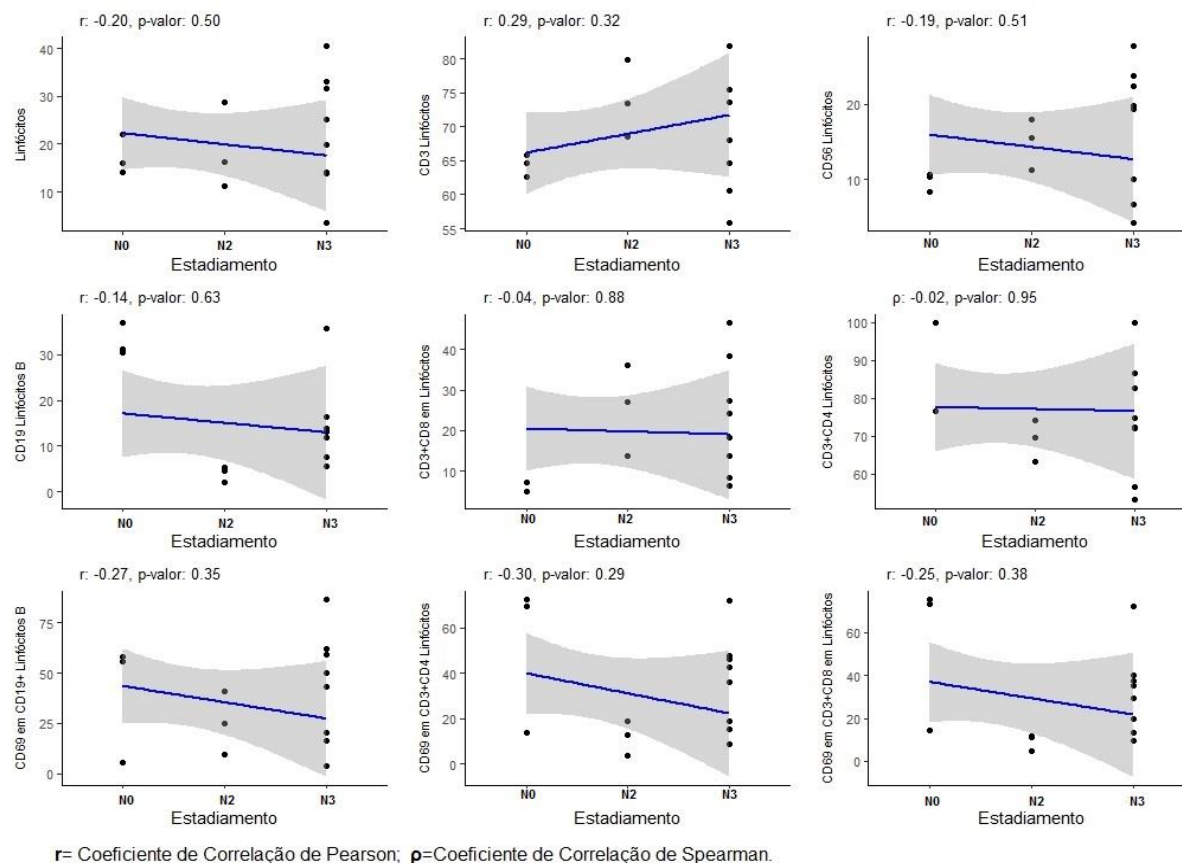


Figura 5 - Correlação entre o acometimento dos linfonodos e a porcentagem de subtipos de linfócitos e de expressão de CD69 nas células

A correlação entre o estadiamento do câncer, representado pelo acometimento dos linfonodos, e a expressão de marcadores em granulócitos foi avaliada e não demonstrou correlações significativas, indicando que a maioria dos marcadores de granulócitos não exibe uma relação direta com a progressão do estadiamento dos linfonodos neste estudo (Figura 6).

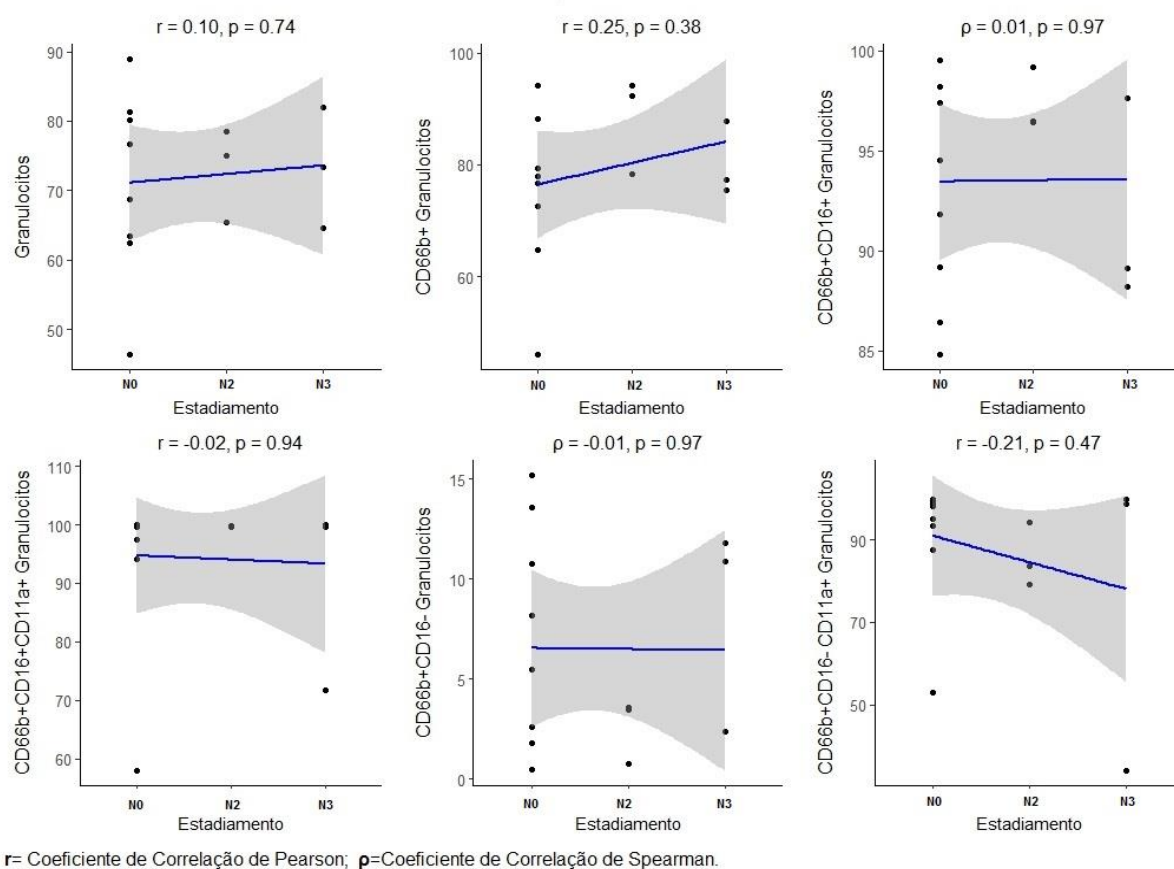


Figura 6 – Correlação entre o acometimento dos linfonodos e a porcentagem de subtipos de granulócitos

A Figura 7 mostra a correlação entre o estadiamento do câncer, baseado no envolvimento dos linfonodos, e a porcentagem de diferentes subtipos de monócitos nos pacientes. Não foram observadas correlações significativas, indicando que a maioria dos marcadores de monócitos também não exibe uma relação direta com a progressão do estadiamento dos linfonodos neste estudo.

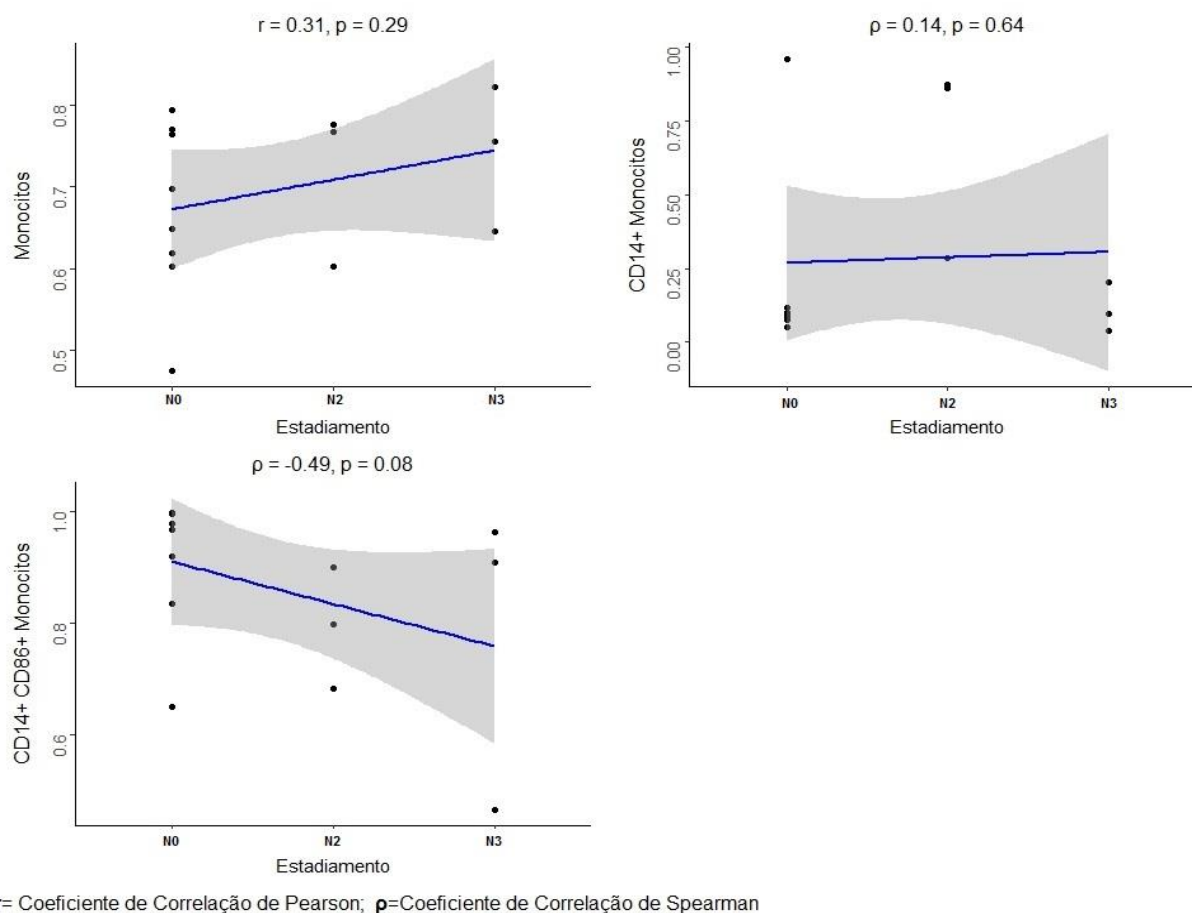


Figura 7 – Correlação entre o acometimento dos linfonodos e a porcentagem de subtipos de monócitos

A Figura 8 mostra a correlação do estadiamento dos linfonodos com a MFI dos subtipos celulares e com a MFI de expressão do marcador de ativação CD69 nas células. Houve uma correlação negativa moderada para MFI de CD69 em Linfócitos T CD3+CD8+ ($r = -0.57$, $p = 0.03$) sugerindo que maiores estádios de linfonodos acometidos estão associados a uma menor expressão do marcador de ativação CD69 em subtipos de linfócitos T CD3+CD8+ no sangue periférico.

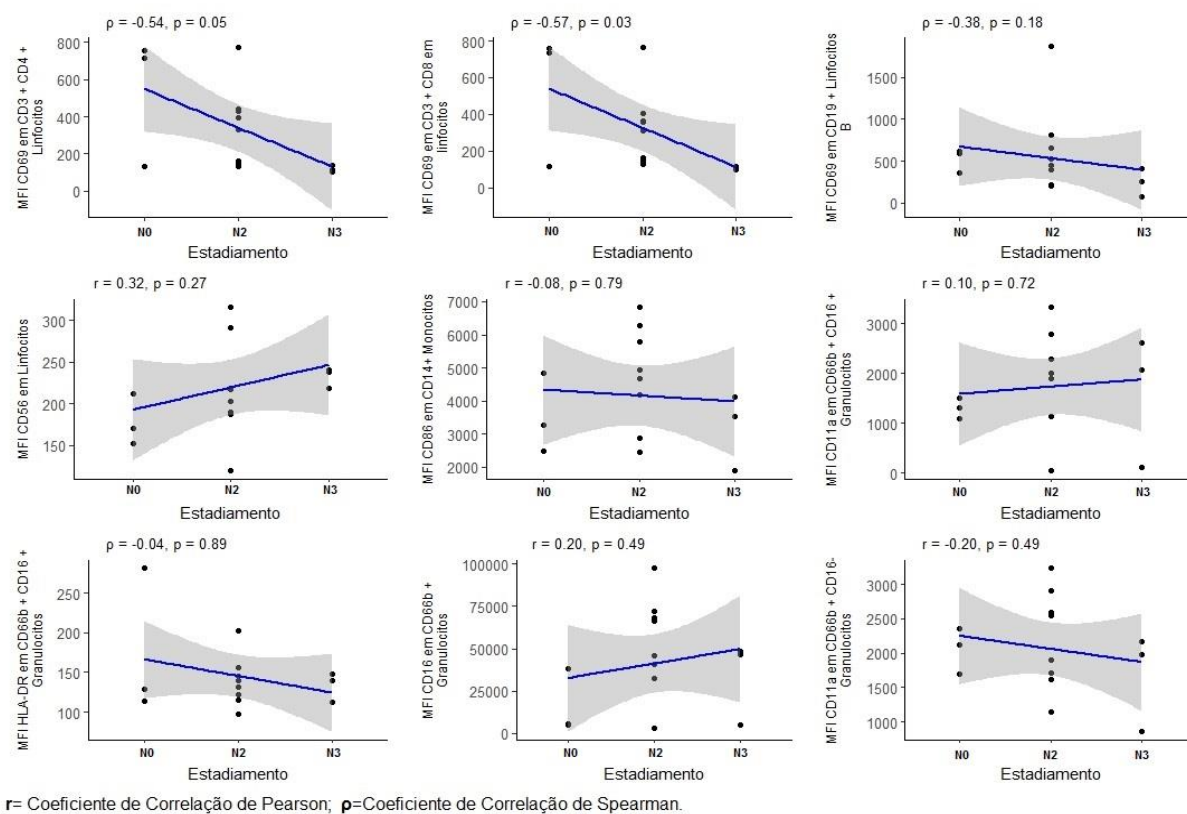


Figura 8 – Correlação entre o acometimento dos linfonodos e a MFI dos subtipos celulares e de expressão do marcador de ativação CD69 nas células

5 DISCUSSÃO

O CEC de cabeça e pescoço causa maior imunossupressão do que outros tipos de câncer. Além da própria neoplasia, deve-se considerar a influência que o tabagismo possui na resposta imunitária e seus efeitos persistentes em longo prazo, uma vez que grande parte dos pacientes com CEC de cabeça e pescoço é tabagista. [18] Alguns estudos a respeito do sistema imunitário no CEC de cabeça e pescoço já foram publicados, porém nenhum deles avaliou, de forma completa, as células envolvidas na resposta imunitária dos pacientes doentes. O estudo de Bose et al (2008) mostrou que a capacidade migratória de células do sistema imunitário foi menor nos pacientes com CEC de cabeça e pescoço em comparação com indivíduos saudáveis pareados por idade. Os autores também sugeriram que o conhecimento do comportamento migratório das células mononucleares seria um passo vital para a imunomodulação. [19] A compreensão da biologia tumoral é fundamental na seleção da estratégia de tratamento.

5.1 Biologia Molecular no Estadiamento e Seguimento do CEC

O progresso no conhecimento da biologia do CEC de cabeça e pescoço, impulsionado por estudos genômicos, contribui para o diagnóstico, estadiamento, avaliação do prognóstico e acompanhamento da resposta aos tratamentos. O estudo dos biomarcadores ainda é incipiente e não permite confiabilidade na indicação terapêutica. A identificação de biomarcadores específicos poderá ser capaz de padronizar tratamentos com base na biologia tumoral. A escolha do tipo de tratamento mais adequado a cada caso, de forma individualizada, poderá ter impacto na sobrevida e na qualidade de vida dos pacientes.

5.2 Biomarcadores do Sistema Imunitário – Células Mononucleares

Apesar do sucesso em outros tipos de tumores, ainda não há estudos conclusivos de biomarcadores relacionados ao CEC de cabeça e pescoço. Muito poucos biomarcadores são atualmente usados na prática clínica e sua validação ainda não ocorreu. [12] Alguns estudos descreveram marcadores hematológicos, incluindo

granulócitos, linfócitos e contagem de plaquetas e proteínas. O papel da proporção entre granulócitos e linfócitos na avaliação do prognóstico foi descrito pela primeira vez no câncer de nasofaringe e, posteriormente, em outros sítios de tumores, como cavidade oral, orofaringe e hipofaringe. [12] A principal vantagem da proporção granulócito / linfócito como biomarcador é sua fácil determinação na rotina da avaliação do hemograma. Mais investigações são necessárias para conclusões definitivas sobre a acurácia e aplicabilidade clínica desta proporção. [12] Os *check-points* solúveis do sistema imunitário e as células NK são biomarcadores não invasivos que podem auxiliar na avaliação das biopsias de tecido. [20]

As taxas de resposta à imunoterapia variam entre 14% e 32% em casos recorrentes ou metastáticos, sendo a resposta ao tratamento imprevisível. Torna-se imperativo compreender o papel das células T, das células NK e das células apresentadoras de antígenos. Moléculas relacionadas ao sistema imunitário apresentam potencial para se tornarem biomarcadores capazes de prever o prognóstico e a resposta ao tratamento. Esses biomarcadores podem abrir caminho para o monitoramento e manejo personalizado do câncer. [8] É necessária a identificação de biomarcadores com boa acurácia para melhorar as estratégias de tratamento e os desfechos clínicos. Estudos pré-clínicos estão concentrados na identificação de biomarcadores que incluem células apresentadoras de antígenos (APC), células T e células NK. A avaliação dessas células auxilia na predição da resposta ao tratamento e do prognóstico. [8]

O estudo de Caruntu et al (2021) com avaliação de 10 pacientes com CEC de boca fez uma comparação entre sangue periférico e infiltrado tumoral através de citometria de fluxo. Os resultados mostraram infiltração tumoral predominante de linfócitos T CD8+, além de aumento de linfócitos B CD19+ nesse infiltrado. No sangue periférico, houve aumento dos linfócitos T *helper* CD4+ e das células NK CD56+ em relação ao infiltrado tumoral. Esses resultados mostram diferença nos subtipos de linfócitos entre o sangue periférico e o infiltrado tumoral, sugerindo existir resposta imunitária local e sistêmica. [21]

5.3 Avaliação do Sistema Imunitário em Pacientes com Câncer

Devido à natureza multifatorial das interações da resposta imunitária ao câncer, considera-se que ensaios com diferentes biomarcadores serão necessários. O imunograma proposto por Blank et al (2016) considera que a atividade das células T é o mecanismo efetor final em tumores humanos. No entanto, os mesmos autores reconhecem que a compreensão da interação tumor-imunidade ainda é incompleta e que o imunograma do câncer não deve ser considerado estático. A expressão das características dos pontos de verificação de células T e seus ligantes são importantes biomarcadores e há perspectiva de que auxiliem na detecção de alvos terapêuticos específicos. As informações necessárias para essa análise podem ser obtidas na combinação da genômica tumoral, imuno-histoquímica e ensaios padrão em compartimento do sangue periférico. [22] Tais medições serão úteis para determinar como as células transitam entre os diferentes compartimentos do imunograma (sangue periférico, linfonodos, infiltrado tumoral), tanto durante interação natural câncer-sistema imunitário quanto após imunoterapia. No entanto, o imunograma tem possibilitado avaliar as interações entre o tumor e o sistema imunitário, auxiliando na escolha das opções de tratamento de forma mais refinada e de maneira personalizada. [22]

5.4 Biomarcadores avaliados neste estudo

Na avaliação da porcentagem das populações de linfócitos em nosso estudo, houve diminuição significativa dos linfócitos totais no grupo de pacientes com CEC em comparação ao grupo de voluntários. Na avaliação dos subgrupos de linfócitos, observou-se aumento estatisticamente significativo da quantidade de células NK CD56+ e do subgrupo de linfócitos CD3+CD4+ nos pacientes com CEC quando comparados aos voluntários. Foi também detectada diminuição do subgrupo de linfócitos CD3+CD8+ nos pacientes com câncer em relação aos voluntários.

Houve aumento da expressão do marcador de ativação CD69 nos linfócitos T CD3+CD4+ e nos linfócitos B CD19+, sugerindo ativação nesses grupos celulares nos pacientes com CEC, possivelmente associada a funções regulatórias dessas células. Na avaliação por MFI, observou-se aumento nas células NK CD56+. No entanto, a expressão aumentada do CD69 foi detectada apenas nos linfócitos B CD19+. A

diferença na expressão de CD69 entre os resultados em porcentagem e em MFI pode ser atribuída à intensidade de expressão desse marcador, uma vez que a porcentagem apresenta apenas a quantidade de células que expressam o marcador, enquanto a fluorescência é proporcional à magnitude de expressão do marcador em cada célula, que é variável e não evidenciada pela porcentagem.

5.5 Linfócitos T CD4+ e CD8+

A resposta imunitária dependente de células T contra antígenos tumorais desempenha um papel crucial na vigilância tumoral, principalmente das células efetoras que são os linfócitos T CD8+. A falha da resposta imunitária ocorre quando as células T CD8+ efectoras são inibidas por estímulos provocados por citocinas solúveis ou interação com outras células. As principais células capazes de induzir apoptose nas células T CD8+ são os linfócitos T reguladores (Treg). [23] As células Treg são um subtipo de linfócitos T CD4+.

Houve diminuição do subgrupo de linfócitos T CD3+CD8+ e aumento do subgrupo de linfócitos T CD3+CD4+ em nosso estudo. Esses achados indicam apoptose de linfócitos T CD8+ que pode estar sendo induzida pelo subtipo de linfócitos Treg do grupo de linfócitos T CD4+ que apresentou aumento percentual e ativação precoce, evidenciada pela maior expressão de CD69. O CD69 tem participação descrita na indução da diferenciação de linfócitos T CD4+ em linfócitos Treg, além de aumentar sua atividade imunossupressora. [24]

5.6 Células NK

As células NK são um tipo de linfócito citotóxico relevante nas respostas imunitárias antitumorais imediatas, visando a células tumorais deficientes em MHC-I. [25] Importante ressaltar que ações inibitórias das células NK ocorrem tanto na circulação periférica quanto no infiltrado tumoral. [20] As células NK estabelecem uma ligação funcional entre a imunidade antitumoral inata e adaptativa, compartilhando alguns receptores e funções com os linfócitos T. Além de exercerem suas funções, as células NK exibem características dos linfócitos Th1 e Th2 CD4+ e, portanto, podem ter uma função dupla na regulação imunitária e de imunovigilância contra tumores. A

regulação negativa nessa população de células NK interfere nas cascatas de sinalização imunitária em pacientes com CEC. Essa diminuição proporcional e funcional das células imunocompetentes pode ser influenciada pela regulação positiva das células T reguladoras, que promovem a regulação negativa das células T e NK e interferem na apresentação de antígenos de várias células, incluindo as dendríticas. [26,27,28]

Caruntu et al (2021) encontraram aumento de células NK CD56+ no sangue periférico de pacientes com CEC de cabeça e pescoço em comparação com o infiltrado tumoral. [21] Há estudos experimentais sugerindo que tanto a deficiência de CD69 quanto a administração do anticorpo antiCD69 causa o aumento de respostas mediadas por células NK na imunidade antitumoral, melhorando a sobrevivência de camundongos. Esses achados sugerem o envolvimento de respostas imunitárias mediadas por células NK. Foram detectados aumento do número de células NK e células T e diminuição na produção de TGF- β por células NK em células tumorais de camundongos com deficiência de CD69. Estes dados sugerem que o CD69 controla respostas imunitárias antitumorais via células T e NK. [25]

Neste estudo, houve aumento de células NK CD56+ no sangue dos pacientes em comparação com os voluntários, associado a aumento de linfócitos T CD4+ e de expressão de CD69 em linfócitos TCD4+ e linfócitos B CD19+, sugerindo uma possível ação do CD69 na mediação da resposta imunitária envolvendo tanto os linfócitos T CD4+ e linfócitos B CD19+ quanto células NK CD56+.

5.7 Linfócitos B

Embora o foco imunitário tumoral esteja em células citotóxicas CD8+ [29,30,31], Yuen et al (2016) constataram imunomodulação pelos linfócitos B, sugerindo respostas antitumorais. Os linfócitos B podem sofrer diferenciação induzida pelo CEC e se tornarem células reguladoras da resposta imunitária. Os linfócitos B reguladores produzem TGF- β que promove a conversão de linfócitos T CD4+ em linfócitos Treg, os quais, por sua vez, inibem as células NK efetoras e os linfócitos T CD8+ efetores, bloqueando a indução da imunidade tumoral mediada por linfócitos T. [32]

Neste estudo houve aumento da expressão de CD69 nos linfócitos B CD19+, indicando ativação precoce deste grupo celular, que pode estar relacionada ao aumento dos linfócitos CD3+CD4+ e possível diferenciação em células Treg, corroborando o papel regulador dos linfócitos B descrito na literatura.

5.8 CD69

O CD69 é uma glicoproteína lectina do tipo C, também conhecida como molécula indutora de ativação. O CD69 é considerado marcador de ativação de linfócitos T e B, por ser um dos primeiros a ser expresso na superfície celular de células ativadas. [33] CD69 representa um dos primeiros marcadores de ativação dos linfócitos T, sendo sua expressão usada como marcador de ativação tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Linfócitos em repouso não expressam CD69, que representa o marcador de ativação inicial, sendo rapidamente induzido na superfície celular após estimulação. A transdução de sinal via CD69 ativa a expressão de genes que codificam citocinas e proliferação de células T periféricas CD4+. O CD69 parece desempenhar um papel duplo na fisiologia celular: por um lado, iniciando a ativação celular e, por outro, mediando a indução de apoptose. Os estudos têm detectado a expressão do CD69 na superfície de vários tipos de células, indicando seu papel na fisiologia celular, como um receptor capaz de provocar ampla gama de respostas de ativação celular. [34,35] Embora o papel preciso do CD69 na função de células imunitárias ainda não tenha sido completamente elucidado, o acúmulo de evidências experimentais revelou que o CD69 pode determinar padrões de liberação de citocinas e de retenção e migração de linfócitos ativados. [36]

A expressão basal de CD69 em linfócitos T de sangue periférico é baixa. [34] O CD69 liga-se ao receptor de superfície S1P1 e prejudica sua expressão, promovendo a retenção de linfócitos recentemente ativados nos órgãos linfoides e tecidos não linfoides. [35,36] A vigilância imunitária inclui saída e retorno de células T dos órgãos linfoides para a circulação. A saída de células T de órgãos linfoides é mediada pela expressão de S1P1 e sua interação com esfingosina-1 fosfato (S1P) da corrente sanguínea. [36]. A S1P, um ligante de S1P1, é um importante mediador de sinalização que controla um conjunto diversificado de processos celulares. Uma vez que a concentração de S1P nos órgãos linfoides é menor do que no sangue e na linfa, a

expressão de S1P1 obriga os linfócitos a saírem dos tecidos linfoides e acessarem a corrente sanguínea através do fluido linfático. É importante ressaltar que o CD69 interage diretamente com S1P1, o que resulta na internalização de S1P1, assim promovendo a retenção de linfócitos nos tecidos linfoides [25]. Evidências recentes revelaram que o CD69 regula algumas funções específicas de subconjuntos de células T selecionados, determinando a taxa de retenção e de migração dessas células nos tecidos, bem como a aquisição de fenótipos efetores ou reguladores.[36]

Segundo Cibrian et al (2017), o CD69 pode controlar o equilíbrio entre células Th17/Tregs. No entanto, este potencial efeito regulatório no equilíbrio dos diferentes subtipos de células T ainda não foi totalmente explorado, estando relacionado com o complexo CD69-S1P1 em tecidos linfoides.[36] De acordo com Gorabi et al (2020) é evidente que o CD69 modula o sistema imunitário por meio de diferentes mecanismos, incluindo reforço na atividade supressora de Tregs, mantendo o equilíbrio entre Th17/Tregs pela prevenção de diferenciação de Th17 e regulação negativa de citocinas próinflamatórias.

Um dos principais mecanismos pelos quais o CD69 exerce sua ação imunomoduladora é o controle da atividade Treg. A expressão de CD69 desempenha um papel fundamental na atividade de Tregs por regulação positiva do TGF- β , que é um fator significativo para indução da atividade supressora Treg. A expressão de CD69 influencia na função supressora das Tregs, pois na comparação de Tregs que expressam CD69 com Tregs que não expressam CD69 observa-se uma função supressora mais robusta para células que expressam CD69 em sua superfície. [24] Além de seu valor intrínseco como um marcador de ativação, evidências recentes sugerem que o CD69 também é um regulador importante das respostas imunitárias. A identificação de ligantes sugere que a sinalização induzida por CD69 pode ser regulada durante contatos entre células T e células apresentadoras de antígenos em órgãos linfoides e na periferia, onde citocinas e outros metabólitos controlam o resultado final da resposta imunitária. [36]

Koyama-Nasu et al (2022) mostraram que CD69 regula negativamente a função efetora das células T intratumorais e controla de forma importante a exaustão de células T CD8+. A exaustão das células T é definida por uma alteração no padrão de expressão gênica, incluindo uma redução na expressão de citocinas e a indução da expressão de receptores inibitórios, como o PD-1. Células T esgotadas mostram-se

menos citotóxicas contra células tumorais do que células T CD8+ não esgotadas. Portanto, o revigoramento das células T CD8+ exauridas é considerada uma estratégia promissora para imunoterapia contra o câncer. Além disso, a administração de anticorpo monoclonal antiCD69 em camundongos demonstrou aumento da imunidade antitumoral.[25]

Arstad et al (2006) mostraram que o aumento da porcentagem de células expressando moléculas de ativação precoce e tardia no sangue periférico predizem diminuição da sobrevida em pacientes com CEC de cabeça e pescoço. [37] Arstad et al (2015) verificaram que a sobrevida em longo prazo diminui conforme o número de linfócitos T positivos para CD69 no sangue periférico. A proteção imunitária pode ser suprimida por linfócitos Tregs que também podem estar presentes no sangue. Foi mostrado que os linfócitos Treg podem ser regulados positivamente nestes pacientes. É possível que os níveis altos de CD69 e sua relação com diminuição da sobrevida em longo prazo estejam relacionados com aumento dos níveis de células Treg [38].

Arstad et al (2006) consideraram que o aumento da porcentagem de expressão de CD69 nos linfócitos de sangue periférico em estádios mais avançados da doença sugere maior ativação dos linfócitos T. Os autores levantaram a hipótese de que linfócitos T específicos podem ser ativados em pacientes com CEC de cabeça e pescoço. O aumento da expressão de CD69 nas células linfoides também foi detectado em outras condições clínicas diretamente relacionadas ao sistema imunitário, tais como a rejeição ao transplante renal e a maior atividade do lúpus eritematoso sistêmico. [37] Estudos mostram que a expressão de CD69 é necessária para o recrutamento e manutenção de células T em tecidos inflamados. Seu valor prognóstico depende do tipo de tumor. [39,40] Foi demonstrado em modelos murinos [41] que o tratamento combinado de células dendríticas pulsadas com lisado de tumor renal e anticorpo bloqueador de CD69 resultou em redução no volume tumoral e aumento na proliferação e atividade de células T, controlando o crescimento tumoral e a produção de citocinas. [42]

As funções do CD69 na regulação da diferenciação de células Th17/Tregs e na retenção tecidual e exaustão de células T são relevantes. Elas estão relacionadas ao papel do CD69 na supressão imunitária em ambientes tumorais. [43] Segundo Li et al (2024), os avanços na compreensão da deficiência de CD69 e do anticorpo antiCD69 permitem avaliar o valor do direcionamento ao CD69 como alvo para imunoterapia

contra o câncer e previsão de prognóstico. A literatura recente mostra que o CD69 pode regular a diferenciação de células Th17/Treg em relação às células Treg, e a expressão de CD69 pelas células pode contribuir para a retenção de células nos linfonodos e no tecido tumoral e maior exaustão. A aplicação de anticorpos antiCD69 potencializa os efeitos antitumorais ao ativar células T inatas e adaptativas, como mostrado em estudos pré-clínicos. Essas evidências indicam que o CD69 pode desempenhar um papel imunoinibitório na imunidade antitumoral. Assim, o CD69 torna-se uma molécula alvo para a imunoterapia contra o câncer. [43]

Neste estudo houve expressão elevada de CD69 em linfócitos T CD4+ e linfócitos B CD19+ em sangue periférico, sugerindo que essas células são propensas à retenção em linfonodos e tecido tumoral. Além disso, o CD69 poderia induzir a formação de células Treg, que reduziram a resposta imunitária ao tumor conforme recentemente descrito na literatura.

Schumacher et al (2024) em um estudo de 20 pacientes com CEC de cabeça e pescoço avançado examinaram por citometria de fluxo se os pacientes em tratamento com resposta à imunoterapia mostrariam diferenças nas subpopulações de células T no sangue periférico em comparação com pacientes com resistência à imunoterapia. Eles encontraram que a expressão de CD69 esteve aumentada entre os linfócitos CD3+ em pacientes com resposta à imunoterapia em relação aos pacientes com falha na resposta à imunoterapia.

Não foram encontradas diferenças entre as porcentagens de Treg entre os pacientes com resposta à imunoterapia e com resistência à imunoterapia. [44] Ou seja, foi verificado que a maior expressão de CD69 em linfócitos contribuiu para resposta ao tratamento, demonstrando que talvez a maior expressão de CD69 seja um marcador de tumores em estádios avançados, mas que podem responder aos inibidores.

5.9 Monócitos e Granulócitos

Os monócitos CD14+ e CD16+ produzem IL-10 e sua ativação em pacientes com câncer eleva a concentração sanguínea dessa interleucina, proporcionalmente ao estágio da neoplasia. [45,46,47]. 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. [47] Há maior ativação de macrófagos imaturos em pacientes com câncer. [48,49,50]

A elevação da relação granulócito/linfócito associa-se a maior resposta inflamatória sistêmica. [51,52,53,54] Os granulócitos atuam de forma pró-tumorigênica, ao serem pró-angiogênicos e suprimirem respostas imunitárias adaptativas. [54,55] Por outro lado, granulócitos ativados apresentam atividade antitumoral e associam-se a aumento da sobrevida. [45,47] Foi detectado maior número de granulócitos circulantes com e menor número de linfócitos em pacientes com CEC de cabeça e pescoço em comparação com indivíduos saudáveis. [48,49,56] O aumento do número de granulócitos e monócitos observado nos pacientes com CEC de cabeça e pescoço no estudo de Bose et al (2008) não difere de estudos anteriores em outros tipos de cânceres. Esses dados indicam aumento da inflamação com infiltração de granulócitos e monócitos imaturos originados da medula óssea como consequência de maior transformação leucocitária. [19] Em nosso estudo, a distribuição de monócitos e granulócitos não apresentou diferença significativa entre os pacientes e os voluntários, possivelmente devido ao estágio avançado dos tumores.

Sathawane et al (2013) detectaram que a expressão de monócitos diminui com o avanço do câncer [47]. Alguns estudos que encontraram valores de granulócitos mais altos incluíram muitos pacientes em estádios menos avançados da doença, como no estudo Caldeira et al (2017) em pacientes com câncer de boca. [48]

5.10 Células do Sistema Imunitário e Acometimento Linfonodal

No CEC, células de linfonodos regionais são um dos primeiros componentes do sistema imunitário a terem contato com as células tumorais e seus produtos. [57] Portanto, o conhecimento do fenótipo e propriedades funcionais das células hematopoiéticas presentes no processo de drenagem das células tumorais e seus produtos pelos linfonodos regionais é importante para entender seu papel no controle de células malignas. Apesar dos linfonodos serem essenciais para o início da resposta imunitária, seu envolvimento no controle do tumor ainda não é suficientemente conhecido. Os eventos que ocorrem nos linfonodos para desencadear uma resposta

imunitária são dinâmicos e dependem de interações com células e moléculas liberadas no local. Os linfócitos podem acessar os linfonodos, transitar e sair do local sob influência de sinais provenientes de citocinas, quimiocinas, proteínas de matriz celular e receptores expressos por células endoteliais. [58]

Verastegui et al (2002) correlacionaram a histologia de linfonodos metastáticos com achados de citometria de fluxo em pacientes com CEC de cabeça e pescoço. Observaram-se mudanças morfológicas e funcionais nestes linfonodos. Houve decréscimo de células T CD8+ e, em alguns linfonodos, a presença de populações secundárias e terciárias de células com granulosidade distinta, além de diferentes marcadores de células NK. Os autores verificaram expressão simultânea de moléculas de superfície específicas de células T (CD3+) e NK (CD16+/CD56+) que poderiam ser responsáveis pelas alterações detectadas. Os autores levantaram a hipótese de que as células NK podem ter alterado a função de outras células hematopoiéticas e, por consequência, facilitado o estabelecimento de metástases. [57] O número baixo de linfócitos T CD8+ pode ser resultado de uma resposta mediada por células T CD4+. Em pacientes com CEC de cabeça e pescoço, a habilidade diminuída das células linfonodais proliferarem sugere anormalidades predominantemente na população de células T CD3+CD4+. [57] No estudo de Verastegui et al (2002), nenhuma alteração foi detectada nas diferentes populações de linfócitos em sangue periférico, sugerindo ausência de alterações sistêmicas e a presença apenas de alterações regionais, seguindo a via de drenagem linfática do tumor. [57]

A existência de células efetoras tumor-específicas e células T supressoras tem sido demonstrada nos linfonodos metastáticos regionais. Tem sido sugerido que a resposta de células T ao tumor é dependente de um balanço delicado entre células T efetoras e células T reguladoras. Produtos de células tumorais possuem um efeito na composição celular dos linfonodos que dão suporte ao crescimento destas células tumorais. Estudos recentes indicam associação entre a composição de células imunitárias dos linfonodos metastáticos e prognóstico do câncer. Recentemente foi reportado que a atividade supressora periférica dos CD25/CD127-Tregs aumentou em pacientes com carcinoma de laringe e orofaringe e associou-se a estadiamento avançado e envolvimento linfonodal. [58]

Células T reguladoras ativadas em linfonodos de drenagem metastáticos possivelmente suprimem a imunidade ao CEC cabeça e pescoço. As células Tregs desempenham um importante papel na criação de um microambiente imunossupressor. No entanto, os mecanismos pelos quais as Tregs são ativadas e suprimem a imunidade ao CEC permanecem obscuros. [59] Há evidências acumuladas sugerindo que as células Tregs, que desempenham um papel crucial na inibição da imunidade antitumoral, podem estar contribuindo para a falha clínica das moléculas inibidoras de checkpoint imunitário. Pesquisas recentes têm se concentrado em encontrar biomarcadores preditivos no sangue ou infiltrado tumoral. Porém a importância da drenagem tumoral dos linfonodos como fonte de células CD4+ e CD8+ e local de importantes eventos imunitários anticancerígenos, como apresentação de antígenos, ativação de células imunitárias, proliferação e diferenciação precisa de maior atenção. [60] Pierciala et al (2022) em estudo realizado com citometria de fluxo em 23 pacientes com CEC de cabeça e pescoço encontraram níveis elevados de Tregs nos linfonodos, além de demonstrar que a expressão de PD-1 e CTLA-4 nestas células Tregs tiveram correlação com o estadiamento linfonodal dos pacientes, mas não com o estadiamento T (tamanho do tumor). [60]

Suzuki et al (2024) analisaram receptores de células Treg e outros subtipos de células T no sangue periférico, linfonodos metastáticos e tumor primário de pacientes com CEC de cabeça e pescoço. Os autores mostraram que o repertório de receptores de células T estava modificado no tecido tumoral e nos linfonodos metastáticos em comparação com linfonodos não metastáticos e que havia grande similaridade do repertório de células Tregs e células T CD8+ nos linfonodos metastáticos e no tecido tumoral. Esses resultados sugerem que Tregs e células T CD8+ são ativadas em linfonodos metastáticos e tecido tumoral por antígenos do câncer, como neoantígenos e antígenos compartilhados. Em consequência de sua ativação, as células Tregs inibiriam a função de células T CD8+ de uma maneira específica para antígenos do câncer no tecido tumoral e nos linfonodos metastáticos. Além disso, linfonodos metastáticos podem ser uma fonte de Tregs e células T CD8+ para o tumor primário. [59]

Após a ativação, os linfócitos T expressam CD69 e são retidos transitoriamente nos linfonodos pela formação do complexo CD69-S1P1 na membrana plasmática. Este complexo regula negativamente a função de saída dos linfócitos, promovendo

assim sua retenção nos linfonodos. As células T CD69+ raramente são encontradas na circulação. A regulação positiva de CD69 é observada após a ativação na maioria das células do sistema hematopoiético, indicando ser um requisito geral para seus efeitos reguladores. [36]

Nesta pesquisa, houve correlação negativa entre o estadiamento linfonodal e a expressão de CD69 por MFI nas células T CD3+CD8+, com diminuição da circulação periférica de células de células T citotóxicas ativadas em estádios mais avançados de metástase linfonodal e possível relação com o mecanismo de retenção linfonodal e exaustão proposto por Koyama-Nasu et al (2022) [25] e Li et al (2024). [43]

Shuang et al (2017) avaliaram 16 pacientes com hepatocarcinoma e compararam as células imunitárias de linfonodos e do sangue periférico por citometria de fluxo. Os autores verificaram que as células dos linfonodos apresentaram características de imunossupressão, refletindo menor atividade proliferativa, citotóxica e maior expressão de PD-1 em comparação com as células do sangue periférico. Essa imunossupressão avançou com a progressão do tumor. A imunossupressão pode ser revertida pela inibição das células Treg e/ou PD-1, o que demonstra que mais pesquisas são necessárias para determinar estratégias que favoreçam a sobrevida dos pacientes. [61]

Chaoul et al (2020) investigaram 14 pacientes com hepatocarcinoma e infecção pelo vírus da hepatite C, comparados com indivíduos saudáveis, por citometria de fluxo. Esses autores encontraram proporções elevadas de células T expressando CD69 no infiltrado tumoral em comparação com o sangue dos pacientes e no sangue dos pacientes em comparação com o sangue dos indivíduos saudáveis. [62] De Rosa et al (2024) avaliaram 28 pacientes com câncer de pulmão submetidos a imunoterapia. Esses autores sugeriram, pela primeira vez, que as células mononucleares sanguíneas possuem potencial para avaliação de características de responsividade imunitária [63]

Portanto, a relação do CD69 com a retenção de células T CD4+ nos linfonodos e sua diferenciação em Tregs, bem como a exaustão das células TCD8+ relacionada também com maior expressão de PD-1 podem ser novos alvos terapêuticos na imunoterapia do câncer. [25,43]

Koyama-Nasu et al (2023) observaram, em modelo murino, que o tratamento antiCD69 melhorou as respostas imunitárias antitumorais e que as terapias combinadas de antiCD69 e antiPD-1 são compatíveis. Esses autores mostraram efeito terapêutico eficiente até mesmo no melanoma imunorrefratário, sem efeitos adversos graves. Segundo eles, o CD69 desempenha um papel crucial na imunidade antitumoral pelo fato de controlar a diferenciação celular em linfonodos nos cânceres humanos. Esses achados justificam a avaliação clínica do anticorpo monoclonal antiCD69 como uma nova estratégia para a imunoterapia do câncer. [64]

São necessários estudos mais específicos incluindo diferentes locais de tumor primário, diversos tipos histológicos, estadiamentos e agentes carcinogênicos para avaliar diferenças na resposta imunitária local e sistêmica. A participação dos linfonodos nessas respostas em cada tipo de câncer também assume grande importância. Suzuki et al (2019) em estudo com pacientes com câncer de mama relataram que a característica genética das células mononucleares de sangue periférico exibe uma assinatura única de expressão gênica em vários tipos de câncer. [65] A identificação de biomarcadores de alta acurácia para orientar a imunoterapia do câncer é necessária. Até o presente momento, nenhum biomarcador preditivo foi estabelecido com base na avaliação direta das funções das células T, que são o principal alvo de ação dos medicamentos antiPD-1. [66]

5.11 Limitações deste Estudo

As principais limitações foram o tamanho amostral reduzido, o método transversal e seleção de pacientes em estádios mais avançados da doença. Por outro lado, são alguns pontos positivos do estudo a amostra ser relativamente homogênea, a inclusão de pacientes sem exposição a tratamento oncológico prévio e o rigor metodológico na realização da citometria de fluxo.

6 CONCLUSÃO

Pacientes com CEC de cabeça e pescoço avançado exibem diminuição de linfócitos totais e linfócitos T CD3+CD8+ associada ao aumento dos linfócitos T CD3+CD4+ e de células NK CD56+. A expressão do marcador de ativação CD69 foi menor com o avanço do acometimento linfonodal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bonilla DL, Reinin G, Chua E. Full Spectrum Flow Cytometry as a Powerful Technology for Cancer Immunotherapy Research. *Front in Mol Biosci* 2021; 7:612801
2. Economopoulou P, Perisanidis C, Evaggelos I, Giotakis AP. The emerging role of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Ann Transl Med* 2016;4(9):173.
3. Freiser ME, Serafini P, Weed DT. The immune system and head and neck squamous cell carcinoma. *Immunol Res* 2013; 57:52–69.
4. Galbiatti ALS, Padovani-Junior JA, Maníglia JV, Rodrigues CDS, Pavarino EC, Bertollo EMG. Head and neck cancer. *Braz J Otorhinolaryngol* 2013; 79(2):239-47.
5. Saada-Bouزيد E, Peyrade F, Guigay J. Molecular genetics of head and neck squamous cell carcinoma. *Current Opinion in Oncology* 2019; 31(3):131-7.
6. Petroianu, A, Boson WL, Bale AE, Friedman E, De Marco L. Mutational analyses of candidate genes in human squamous cell carcinomas. *Laryngoscope* 1999; 109(4): 661-3.
7. 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.
8. Mestiri S, El-Ella DMA, Fernandes Q et al. The dynamic role of immune checkpoint molecules in diagnosis, prognosis, and treatment of head and neck cancers. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2024; vol. 171.
9. De Rosa V, Di Rella F, Di Giacomo A, Matarese G. Regulatory T cells as suppressors of antitumor immunity. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2017; 35: 15–25.
10. Ferris RL. Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33 (29): 3293-3304.
11. Galmiche A, Saidak Z, Bouaoud J et al. Genomics and precision surgery for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer letters* 2020; 481: 45-54.
12. Volker B, Tinhofer I. Novel prognostic clinical factors and biomarkers for outcome prediction in head and neck cancer. *Lancet Oncol* 2019; 20: e313–26.

13. Dyikanov D, Zaitsev A, Vasileva T et al. Comprehensive peripheral blood immunoprofiling reveals five immunotypes with immunotherapy response characteristics in patients with cancer. *Cancer Cell* 2024; 42: 759–779.
14. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, et al. Toxicity and response criteria of the eastern cooperative oncology group. *Am J Clin Oncol*. 1982;5(6):649-55.
15. American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. Eighth Edition. 2017.
16. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. 2021. Retrieved from <https://www.R-project.org/>
17. WICKHAM, H. Programming with ggplot2. In *ggplot2*. Springer, Cham, 241-253, Dec. 2014.
18. Saint-André V, Charbit B, Biton A et al. Smoking changes adaptive immunity with persistent effects. *Nature* 2024;626: 827-851.
19. 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
20. Raza A, Bourouba M, Dermime S. Genomics, proteomics and immunological signatures as diagnostic, predictive, and prognostic biomarkers in head and neck cancers. *Frontiers in Immunology* 2023; 14:1122736.
21. Caruntu A, Moraru L, Surcel M et al. Assessment of immune cell populations in tumor tissue and peripheral blood samples from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Analytical Cellular Pathology* 2021; 7p.
22. Blank CU, Haanen JB, Ribas A, Schumacher TN. The “cancer immunogram”. *Science* 2016; 352 (6286): 658-660.
23. Perri F, Ionna F, Longo F. Immune response against head and neck cancer. *Translational Oncology* 2020; 13 (2): 262–274
24. Gorabi AM, Hajighasemi S, Kiaie N. The pivotal role of CD69 in autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* 2020; 111: 102453.
25. Koyama-Nasu R, Wang Y, Hasegawa I. The cellular and molecular basis of CD69 function on antitumoral immunity. *International Immunology* 2022; 34 (11): 555–561.

26. 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.
27. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting. *Nature Immunol* 2002; 3: 992-998.
28. 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.
29. 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.
30. 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. *Cancer Treat Rev* 2018; 65:54–64.
31. 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.
32. Yuen GJ, Demissie E, Pillai S. B Lymphocytes and Cancer: A Love–Hate Relationship. *Trends in cancer* 2016; 2 (12): 747-757.
33. Sales MM, Vasconcelos DM. Citometria de Fluxo: aplicações no Laboratório Clínico e de Pesquisa. Atheneu, 2013.
34. Marziol R, Mauel J, Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol and immunotoxicol* 1999; 21:565-582
35. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 10ª ed. Guanabara Koogan, 2022.
36. Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur. J. Immunol.* 2017; 47: 946–953
37. Aarstad HJ, Heimdal JH, Klementsén JO, Ulvestad E. Prevalence of activated T lymphocytes in peripheral blood of head and neck squamous cell carcinoma patients predicts impaired prognosis. *Acta Oto-Laryngologica* 2006; 126: 1326-1333.

38. 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.
39. Geissler K, Fornara P, Lautenschläger C, Holzhausen HJ, Seliger B, Riemann D. Immune signature of tumor infiltrating immune cells in renal cancer. *OncolImmunology*. 2015;4(1):44.
40. Taylor ES, McCall JL, Shen S, Girardin A, Munro FM, Black MA, et al. Prognostic roles for IL -2-producing and CD 69 + T cell subsets in colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2018;143(8):2008–16.
41. Wei SM, Pan HL, Wang L, Yin GL, Zhong K, Zhou Y, et al. Combination therapy with dendritic cell-based vaccine and antiCD69 antibody enhances antitumor efficacy in renal cell carcinoma-bearing mice. *Turk J Med Sci*. 2017;47:658–67.
42. Mita Y, Kimura MY, Hayashizaki K, Koyama-Nasu R, Ito T, Motohashi S, et al. Crucial role of CD69 in antitumor immunity through regulating the exhaustion of tumor-infiltrating T cells. *International Immunology*. 2018;30(12):559–67
43. Li Y, Gu Y, Yang P. CD69 is a Promising Immunotherapy and Prognosis Prediction Target in Cancer. *ImmunoTargets and Therapy* 2024; 13:1-14.
44. Schumacher M, Beer S, Ribeiro EM et al. Treatment response of advanced HNSCC towards immune checkpoint inhibition is associated with an activated effector memory T cell phenotype. *Front. Oncol* 2024; 14:1333640.
45. Gavrielatou N, Doulas S, Economopoulou P, Foukas PG, Psyrri A. Biomarkers for immunotherapy response in head and neck cancer. *Cancer Treat Rev* 2020; 84:1-8.
46. 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.
47. 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.
48. 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.

49. 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
50. Carneiro BGMC, Resende V, Alberti LR, Petroianu A. Relação entre câncer, alergia e imunomoduladores. *Rev Med Minas Gerais* 2017; 27: 1877-1895.
51. Carneiro BGMC, Petroianu A. The relationship between cancer and allergy. *Appl Cancer Res* 2011; 31:143-145.
52. Alberti LR, Caldeira DAM, Petroianu A. Comparação entre história de alergia e infecção em crianças e adolescentes. *Rev Bras Medicina* 2010; 67:277-80.
53. Carneiro BGMC, Petroianu A, Machado JAN et al. Clinical and immunological allergy assessment in cancer patients. *Scientific Reports* 2021; 11: 18110.
54. Petroianu A, Vasconcelos LS, Sabino KR, Simal CJR. Atividade fagocitária do sistema mononuclear fagocitário na gravidez. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2003; 25:213-218.
55. Petroianu A, Chaves DNB. Comparative incidence of allergy in presence or not of cancer. *J Int Med Res* 1995(5); 23: 358-63.
56. 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.
57. Verastegui E, Morales R, Barrera JL et al. Immunological approach in the evaluation of regional lymph nodes of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Immunology* 2002; 102: 37-47.
58. Norouzian M, Mehdipour F, Ashraf MJ, Khademi B, Ghaderi A. Regulatory and effector T cell subsets in tumor-draining lymph nodes of patients with squamous cell carcinoma of head and neck. *BMC Immunology* 2022; 23:56.
59. Suzuki S, Toyonori T, Saito M et al. Regulatory T-cells activated in metastatic draining lymph nodes possibly suppress cancer immunity in cancer tissues of head and neck squamous cell cancer. *Pathology International* 2024; 74:327-336.
60. Piersiala K, Neves da Silva PF, Lagebro V et al. Tumour-draining lymph nodes in head and neck cancer are characterized by accumulation of CTLA-4 and PD-1 expressing Treg cells. *Translational Oncology* 2022; 23:101469.

61. Shuang YZ, Mao YZ, Liu YC. The tumor-draining lymph nodes are immunosuppressed in patients with hepatocellular carcinoma. *Transl Cancer Res* 2017; 6(6): 1188-1196.
62. Chaoul N, Mancarella S, Lupo L et al. Impaired antitumor T cell response in hepatocellular carcinoma. *Cancers* 2020; 12, 627.
63. De Rosa C, Iommelli F, De Rosa V et al. PBMCs as tool for identification of novel immunotherapy biomarkers in lung cancer. *Biomedicines* 2024; 12, 809.
64. Koyama-Nasu R, Kimura MY, Kiuchi M. CD69 Imposes Tumor-Specific CD8+ T-cell Fate in Tumor-Draining Lymph Nodes. *Cancer Immunol Res* 2023; 11(8): 1085-1099.
65. Suzuki E, Sugimoto M, Kawaguchi K. Gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells may contribute to the identification and immunological classification of breast cancer patients. *Breast cancer* 2019; 6:282-289.
66. Nixon AB, Schalper KA, Jacobs I et al. Peripheral immune-based biomarkers in cancer immunotherapy: can we realize their predictive potential? *Journal for Immuno Therapy of Cancer* 2019; 7:325.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Carta de aprovação no CEP 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

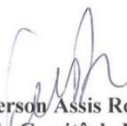
DECISÃO:

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: 000622812009 - 4

Alameda Vereador Álvaro Celso, 100 - Santa Efigênia - Belo Horizonte/MG
CEP: 30150-260 - Fone: (031) 3239-9500
Site: <http://www.fhemig.mg.gov.br/> E-mail: cep@fhemig.mg.gov.br

APÊNDICE B – Reativação da aprovação do projeto no CEP da FHEMIG -Inserção na Plataforma Brasil



Público
Pesquisador
Alterar Meus Dados

Cadastros

ADRIANA

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: RELAÇÃO ENTRE CÂNCER E ALERGIA
Pesquisador Responsável: BRUNO GUSTAVO MUZZI CARVALHO E CARNEIRO
Área Temática:
Versão: 1
CAAE:
Submetido em:
Instituição Proponente: Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais - FHEMIG
Situação da Versão do Projeto: Em Edição
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio



DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

Versão em Tramitação (PO) - Versão 1

Projeto Original

Curriculo dos Assistentes
ADRIANA TORRES DA SILVA

Projeto Completo

Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações
-------------------	----------	---------	----------	-------

APÊNDICE B2 - Atualização do projeto no CEP da FHEMIG - Equipe de Pesquisa

plataformabrasil.saude.gov.br/visao_pesquisador/brasil/estrutura/usuario/gerar

*** Pesquisador Principal:**

CPF Documento	Nome Social
	BRUNO GUSTAVO MUZZI CARVALHO E CARNEIRO

Telefone

E-mail

brunomuzzi@gmail.com

*** Deseja delegar a autorização de preenchimento deste projeto a outras pessoas já cadastradas no sistema?**

☒ Sim ☐ Não

ASSISTENTES:

CPF Documento	Nome Social	Telefone	E-mail	Ação
	ADRIANA TORRES DA SILVA		adriatorres@fhemig.br	Adicionar Assistente

EQUIPE DE PESQUISA:

CPF Documento	Nome Social	Ação
	ADRIANA TORRES DA SILVA	Adicionar membro à equipe
	Ana Cristina Simões e Silva	Adicionar membro à equipe
	Andy Petroianu	Adicionar membro à equipe
	Enca Leandro Marciano Viera	Adicionar membro à equipe

*** Instituição Proponente:**

19.843.929/0001-00 - Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais - FHEMIG

APÊNDICE C – Identificação, anamnese, fatores de risco e marcadores imunitários

Identificação

Nome:		Data Entrevista: / /	
Sexo ☐ masculino ☐ feminino	D.N. / /	Idade: anos	Prontuário:
Cor: ☐ leuco ☐ feo ☐ melanodérmico			
Profissão:			
Endereço:			
Telefones:		e-mail:	

Doenças associadas e hábitos de vida

☐ HAS	☐ DM tipo: ☐ 1 ☐ 2	☐ Arritmia	☐ Valvopatia
☐ ICC	☐ Dislipidemia	☐ Obesidade	☐ Enxaqueca
☐ AVC prévio	☐ DAC	☐ D. arterial periférica	☐ Gravidez/Puerpério
☐ Hipercoagulabilidade	☐ Trombocitose	☐ D. Chagas	
☐ D. Auto-imune: ☐ AR ☐ LES ☐ Outras:		☐ HIV ☐ Outra imunossupressão	
☐ Etilismo: qtde:			
☐ Tabagismo: ☐ prévio (parou há anos) ☐ atual – qtde: anos.maço			
☐ Carcinógeno ocupacional (qual):			
☐ Neoplasia prévia (qual):			

Medicamentos em uso – especificar

☐ Antihipertensivo	☐ Hipoglicemiante
☐ Hipolipemiante	☐ Antiagregante plaquetário
☐ Anticoagulante	☐ Antibiótico
☐ Analgésico	☐ Antidepressivo
☐ Antihistamínico	☐ Corticoide
☐ Antileucotrieno	☐ Outro(s)

Alergia

☐ Sim ☐ Não	
☐ Atual ☐ Pregressa: até quando (ano)	
Idade do início dos Sintomas: anos	
☐ Asma	☐ Rinite alérgica
☐ Dermatite atópica	☐ Urticária
☐ Alergia a medicamentos (qual):	☐ Alimentos:
☐ Poeira	☐ Mofo
☐ Pelos de animais – qual: ☐ Cachorro ☐ Gato ☐ Aves ☐ Outros:	
☐ Alergenos ocupacionais: ☐ Pesticidas ☐ Outros:	

Tratamento

Operação ☐ não ☐ sim – data: / / Tipo:
☐ Anátomo Patológico ☐ Biopsia:

Estadiamento

T__N__ M__ → EC ☐ I ☐ II ☐ III ☐ IV	
INCLUSÃO:	NÃO INCLUSÃO
- diagnóstico histológico de câncer - ainda não operados do câncer	- história prévia de outro câncer - uso de tratamento imunitário sistêmico (imunomoduladores ou imunossupressores) - corticoterapia prolongada - passado de quimioterapia ou radioterapia - doença do sistema imunitária (AR, LES, HIV, etc) - infecção ativa

APÊNDICE D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TÍTULO DA PESQUISA: Relação entre neoplasias malignas e alergia

PESQUISADORES: Bruno Gustavo Muzzi Carvalho e Carneiro / Adriana Torres da Silva

INTRODUÇÃO: Antes de aceitar participar desta pesquisa, é necessário que você leia e compreenda a explicação sobre o procedimento proposto. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e precauções do estudo.

OBJETIVO DA PESQUISA: Avaliar a relação entre neoplasias malignas e alergia, com o auxílio de exames de alergia no sangue.

RESUMO: Você é convidado(a) a participar desta pesquisa porque está em tratamento oncológico neste hospital ou como pessoa sadia para ser comparada com os pacientes.

Existem muitos fatores ainda desconhecidos sobre as doenças malignas, principalmente com as defesas do organismo e a alergia. Atualmente, há condições de se fazer exames para investigar se há relação entre alergia e neoplasias malignas.

PROCEDIMENTO: A sua participação no estudo requer que se faça uma entrevista e uma coleta de uma pequena quantidade (5 mililitros, equivalente a uma colher de sopa) de sangue em uma veia do seu braço. Essa coleta será realizada pelo pesquisador ou por um técnico de laboratório do Hospital devidamente treinado. O material utilizado será totalmente descartável.

DESCONFORTOS: A introdução da agulha para a coleta de sangue poderá causar um desconforto no local, acompanhado ou não de uma pequena inflamação transitória.

BENEFÍCIOS: Sua participação irá contribuir para o conhecimento médico das doenças malignas com seus fatores relacionados e irá beneficiar futuros estudos para seu melhor diagnóstico e tratamento.

SIGILO: Todos os dados que identificam você, tais como número do prontuário, nome, idade, doenças, etc, serão mantidos em sigilo absoluto. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza a fornecer os dados colhidos da pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG) e depois divulgá-los em meio médico-científico sem que você seja identificado.

DESLIGAMENTO DA PESQUISA: A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou o seu desligamento não acarretará prejuízo algum para você ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá interromper sua participação a qualquer momento, sem interferência em seu tratamento ou relacionamento com o pesquisador e o hospital.

CONTATO COM O PESQUISADOR: Pode ser feito com o Dr. Bruno Gustavo Muzzi Carvalho e Carneiro, pelo telefone (31) 9298-1013 ou com a Dra Adriana Torres da Silva pelo telefone (31) 988477152. Caso tenha dúvidas sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, você poderá entrar em contato com o Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da FHEMIG.

CONSENTIMENTO: Li e entendi as informações precedentes. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Este formulário é assinado voluntariamente por mim, indicando o meu consentimento para que eu participe do estudo, até eu decidir o contrário.

Figura A1 – Estratégia Utilizada para Análise de Linfócitos

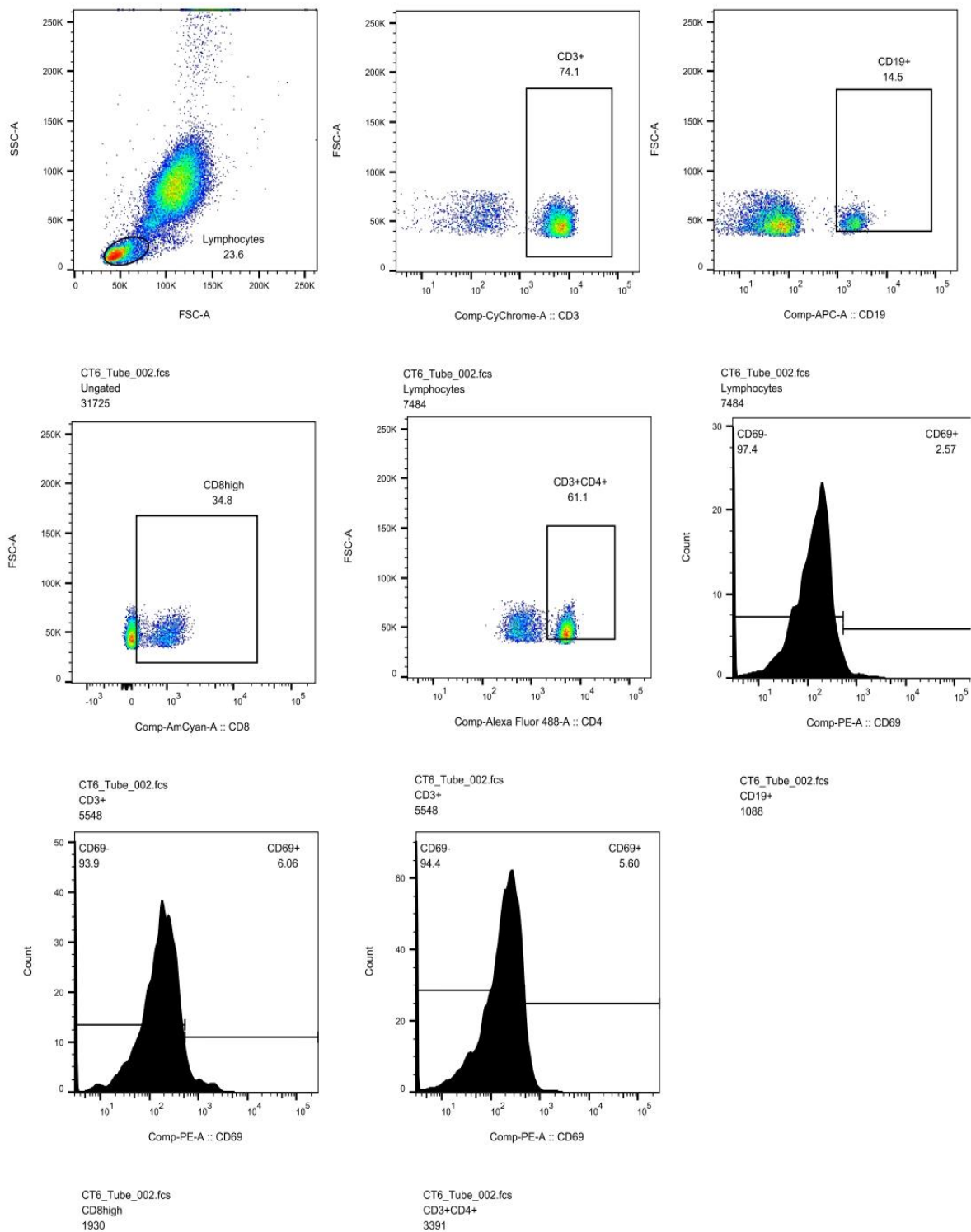


Figura A2 – Estratégia Utilizada para Análise de Granulócitos

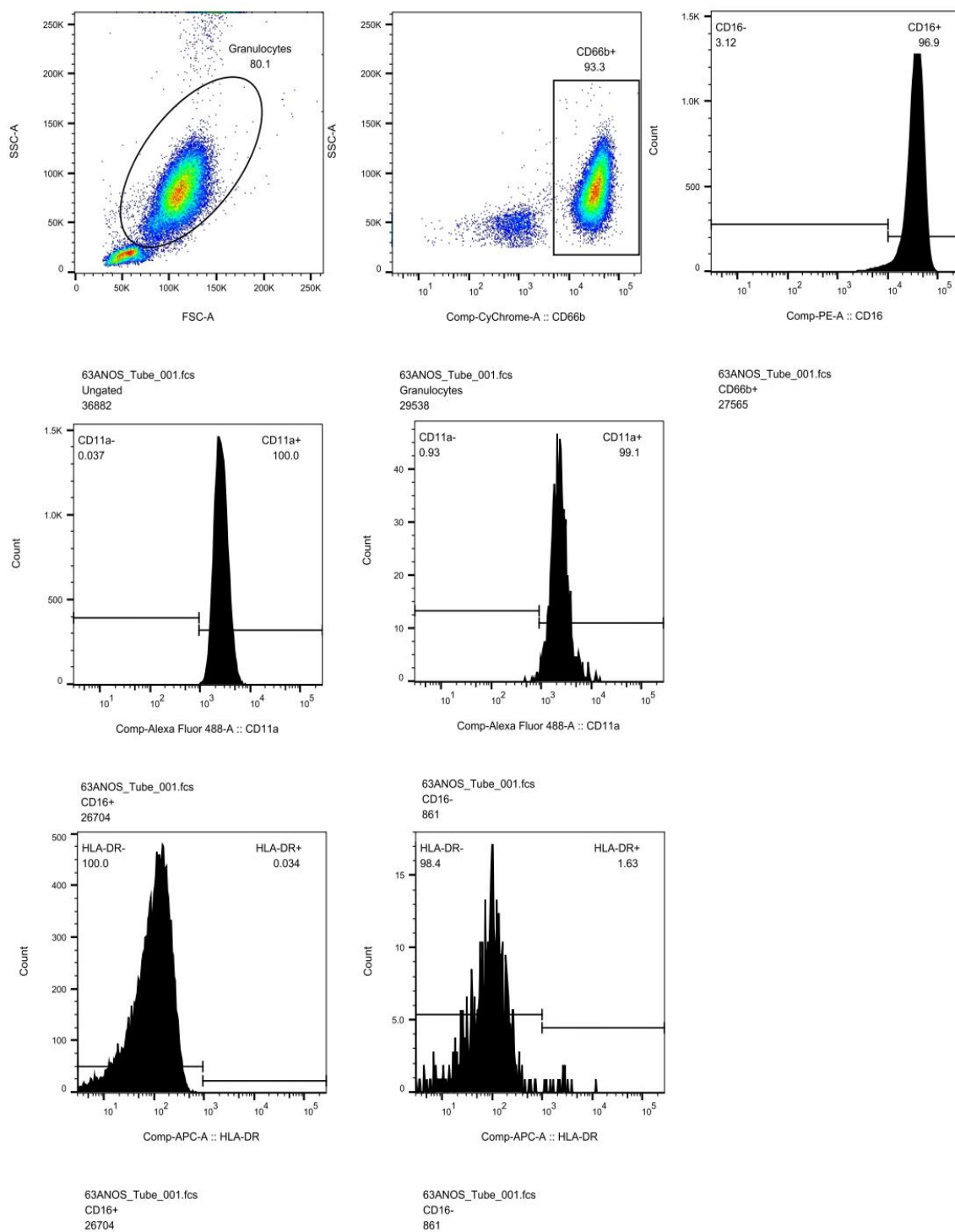


Figura A3 – Estratégia Utilizada para Análise de Monócitos e Células NK

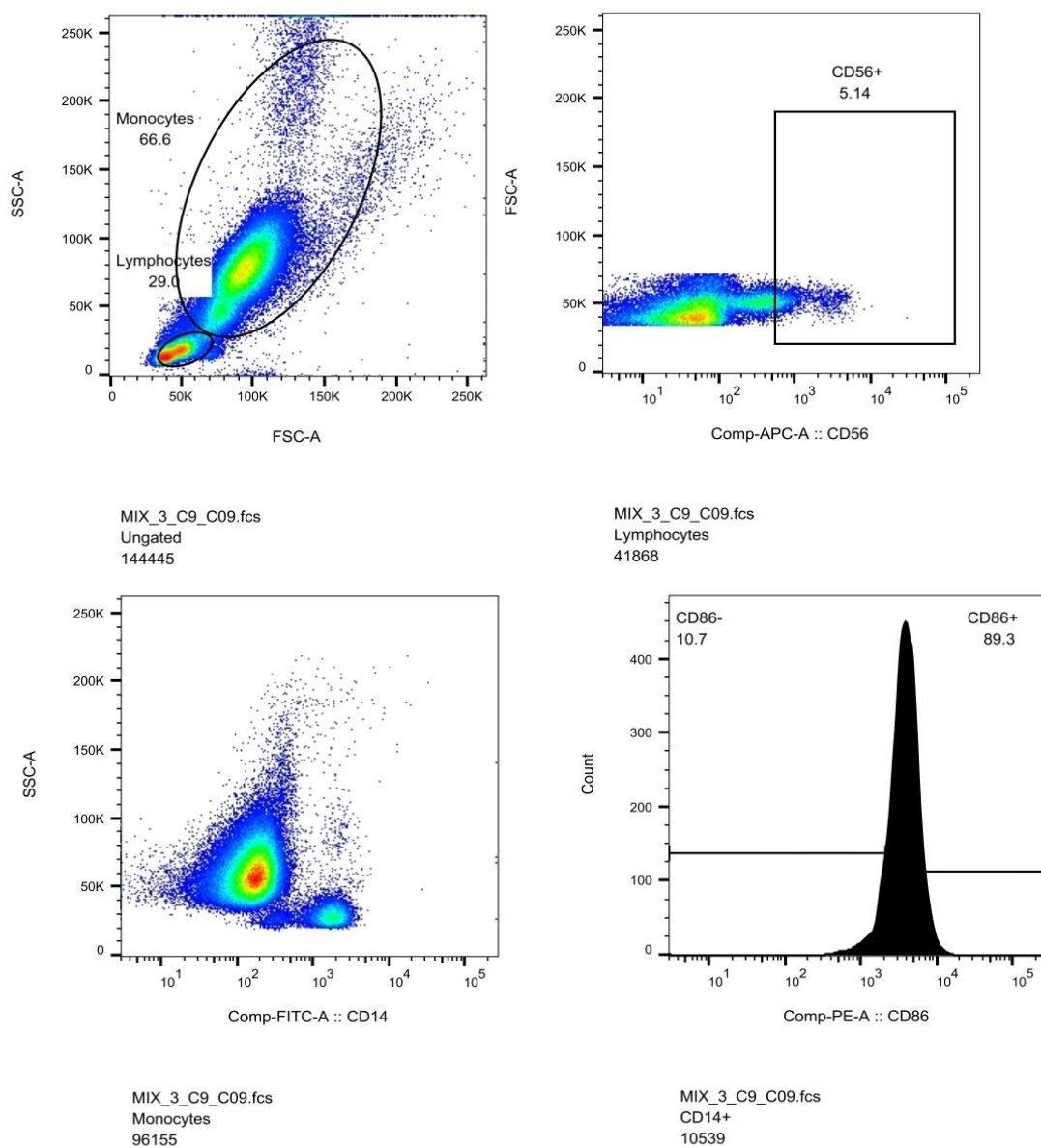


Figura A4 – Heat map esquemático dos Painéis de Citometria

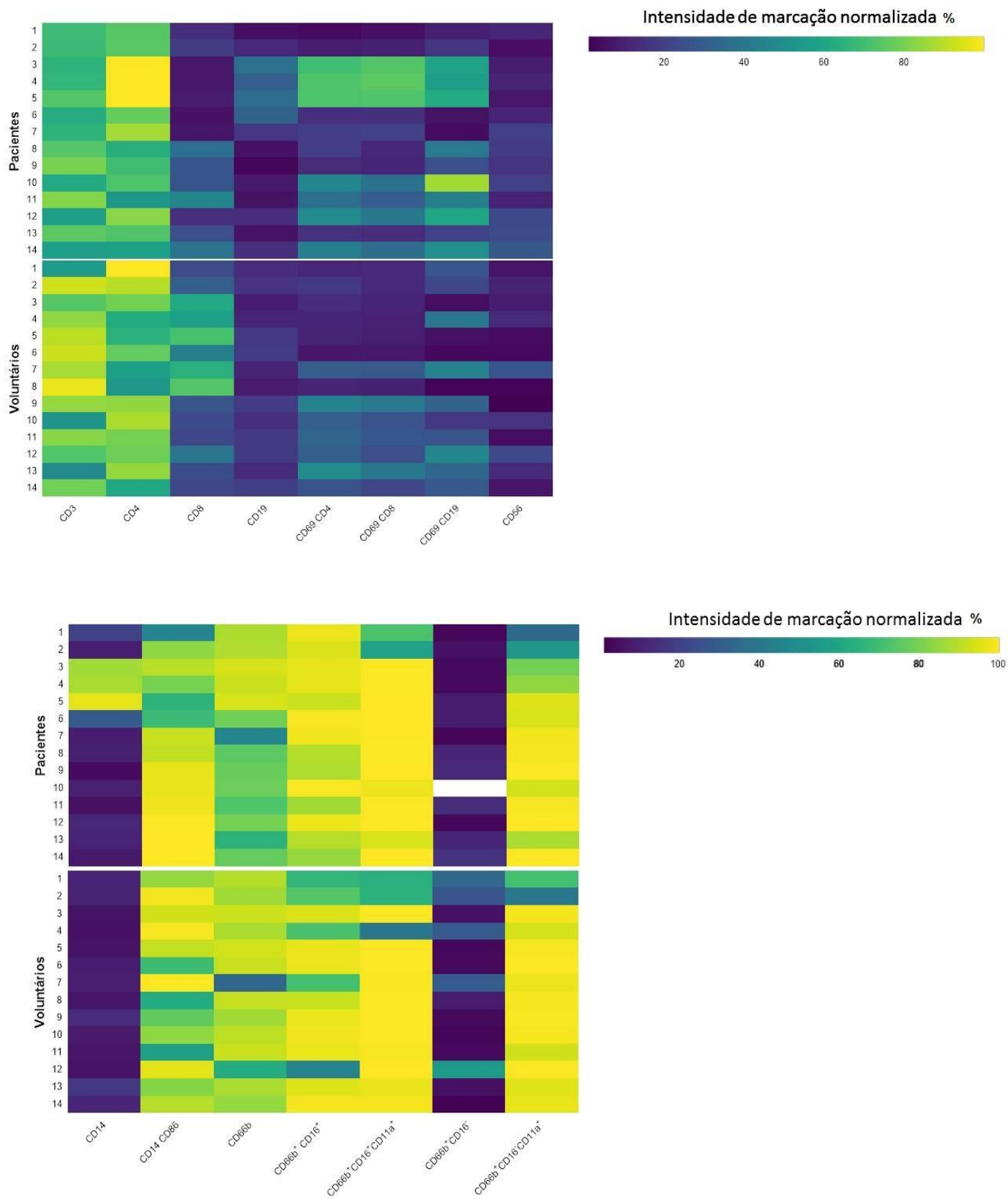


Tabela A1- Correlações entre estadiamento dos linfonodos e Biomarcadores Imunitários

TABELA DE CORRELAÇÕES				
Grupo	Valor	Coefficiente de correlação	p	Classificação da correlação
LINFÓCITOS	-0,20	Pearson	0,50	Fraca
CD3+	0,29	Pearson	0,32	Fraca
CD56+	-0,19	Pearson	0,51	Fraca
CD19+	-0,14	Pearson	0,63	Fraca
CD3+CD8+	-0,04	Pearson	0,88	Fraca
CD3+CD4+	-0,03	Spearman	0,95	Fraca
CD69 CD19+	-0,27	Pearson	0,35	Fraca
CD69 CD3+CD8+	-0,3	Pearson	0,29	Fraca
CD69 CD3+CD4+	-0,25	Pearson	0,38	Fraca
GRANULÓCITOS	0,10	Pearson	0,74	Fraca
CD66b+	0,25	Pearson	0,38	Fraca
CD66b+CD16+	0,01	Pearson	0,97	Fraca
CD66b+CD16+CD11a+	0,02	Spearman	0,94	Fraca
CD66b+CD16-	-0,01	Pearson	0,97	Fraca
CD66b+CD16-CD11a+	-0,21	Pearson	0,47	Moderada
MONÓCITOS	0,31	Pearson	0,29	Fraca
CD14+	0,14	Spearman	0,64	Fraca
CD14+CD86+	0,49	Spearman	0,08	Moderada
MFI				
MFI CD69 CD3+CD4+	-0,55	Spearman	0,05	Moderada
MFI CD69 CD3+CD8+	-0,57	Spearman	0,03*	Moderada
MFI CD69 CD19+ LB	-0,38	Pearson	0,18	Fraca
MFI CD56+	0,32	Pearson	0,27	Fraca
MFI CD86 CD14+	-0,08	Pearson	0,79	Fraca
MFI CD11aCD66b+CD16+	0,10	Spearman	0,72	Fraca
MFI HLA-DRCD66b+CD16+	0,04	Pearson	0,89	Fraca
MFI CD16+CD66b+	0,20	Spearman	0,49	Fraca
MFI CD11aCD66B+CD16-	-0,20	Pearson	0,49	Fraca

*correlação significativa

Tabela A2 - Comparação dos percentuais dos subtipos de linfócitos entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis

Biomarcadores	Grupo	1º quartil	Mediana	3º quartil	Teste de normalidade^a
Linfocitos	Pacientes	14,0	18,0	27,9	0,78
	Voluntários	23,3	25,5	31,0	0,10
Linfócitos CD3+	Pacientes	63,1	67,0	73,6	0,75
	Voluntários	58,6	66,6	71,6	0,06
Linfócitos CD56+	Pacientes	10,1	13,4	19,7	0,64
	Voluntários	3,3	5,9	10,3	0,10
CD69 em Linfócitos B CD19+	Pacientes	17,2	42,1	57,6	0,41
	Voluntários	6,6	21,8	26,3	0,24
CD69 em Linfócitos CD3+CD8+	Pacientes	12,0	24,6	39,6	0,02
	Voluntários	8,3	13,5	21,8	0,03
CD69 em Linfócitos CD3+CD4+	Pacientes	14,3	27,6	47,4	0,07
	Voluntários	9,1	17,4	24,3	0,10
Linfócitos B CD19+	Pacientes	5,5	12,5	26,9	0,02
	Voluntários	9,3	12,2	14,0	0,28
Linfocitos CD3+CD8+	Pacientes	7,6	16,1	27,3	0,13
	Voluntários	19,0	27,8	48,0	0,02
Linfocitos CD3+CD4+	Pacientes	70,2	74,3	85,7	0,28
	Voluntários	49,9	63,0	67,4	0,50

a= Shapiro-Wilk

Nota: A análise foi realizada utilizando o teste t de Student para dados com distribuição normal e o teste de Mann-Whitney U para dados com distribuição não normal, conforme indicado pelos resultados do teste de normalidade de Shapiro-Wilk

Tabela A3 - Comparação dos percentuais dos subtipos de granulócitos entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis

Biomarcadores	Grupo	1º quartil	Mediana	3º quartil	Teste de normalidade_a
Granulocitos	Pacientes	64,8	74,2	79,8	0,53
	Voluntários	61,8	68,0	70,5	<0,001
Granulocitos CD66b+	Pacientes	75,8	78,1	88,2	0,07
	Voluntários	86,4	88,3	91,7	<0,001
Granulocitos CD66b+CD16+CD11a+	Pacientes	98,0	99,8	99,9	<0,001
	Voluntários	97,2	99,5	99,7	<0,001
Granulocitos CD66b+CD16-CD11a+	Pacientes	84,7	94,7	98,9	<0,001
	Voluntários	94,1	98,0	99,0	<0,001
Granulocitos CD66b+CD16-	Pacientes	2,5	4,5	10,9	0,10
	Voluntários	3,0	5,0	28,0	0,002
Granulocitos CD66b+CD16+	Pacientes	89,1	95,5	97,6	0,10
	Voluntários	72,0	95,0	97,0	0,002

a= Shapiro-Wilk

Nota: A análise foi realizada utilizando o teste t de Student para dados com distribuição normal e o teste de Mann-Whitney U para dados com distribuição não normal, conforme indicado pelos resultados do teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

Tabela A4 - Comparação dos percentuais dos subtipos de monócitos entre pacientes com CEC de cabeça e pescoço e voluntários saudáveis

Biomarcadores	Grupo	1º	Mediana	3º	Teste de normalidade
		quartil		quartil	^a
Monocitos	Pacientes	62,6	72,7	77,0	0,15
	Voluntários	64,8	70,8	73,6	0,11
Monocitos CD14+	Pacientes	8,3	9,9	26,6	0,00
	Voluntários	5,6	8,1	10,2	0,05
Monocitos CD14+CD86+	Pacientes	80,7	91,5	97,6	0,01
	Voluntários	77,5	86,7	95,3	0,14

a= Shapiro-Wilk

Nota: A análise foi realizada utilizando o teste T de Student para dados com distribuição normal e o teste de Mann-Whitney U para dados com distribuição não normal, conforme indicado pelos resultados do teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

Tabela A5 – Comparação por MFI dos subtipos de células imunitárias e da expressão do marcador de ativação CD69 entre pacientes com CEC e voluntários saudáveis

Biomarcadores	Grupo	1º quartil	Mediana	3º quartil	Teste de normalidade ^a
MFI CD69 em	Pacientes	118	236,5	394	0,00
Linfócitos CD3+CD8 +	Voluntários	147	175,5	234	0,60
MFI CD69 em	Pacientes	135,5	245,5	439	0,01
Linfócitos CD3+CD4+	Voluntários	150,8	185,5	208	0,55
MFI CD11a em	Pacientes	1693,8	2053	2494	1,00
Granulócitos CD66b+CD16-	Voluntários	1848	2277	2702	0,04
MFI CD16 em	Pacientes	12274,3	43284	62092	0,27
Granulócitos CD66b+	Voluntários	25963,8	44993,5	56209	0,48
MFI CD69 em	Pacientes	277,8	431,5	614	0,00
Linfócitos B CD19+	Voluntários	155,5	202,5	252	0,23
MFI HLA-DR em	Pacientes	116,8	135,5	147	0,00
Granulócitos CD66b+CD16+	Voluntários	120,5	141,5	155	0,23
MFI CD11a em	Pacientes	1184	1944,5	2237	0,76
Granulócitos CD66b+CD16+	Voluntários	2236,8	2613	2797	0,00
MFI CD56 em	Pacientes	188,5	215	240	0,60
Linfócitos	Voluntários	48,2	78,8	163	0,02
MFI CD86	Pacientes	2978	4155	4905	0,83
em Monócitos CD14+	Voluntários	2769	3349,5	3904	0,27

a= Shapiro-Wilk

Nota: A análise foi realizada utilizando o teste T de Student para dados com distribuição normal e o teste de Mann-Whitney U para dados com distribuição não normal, conforme indicado pelos resultados do teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

Tabela A6 – Valores individuais em porcentagem dos subgrupos de linfócitos nos pacientes

Grupos celulares	PC 1	PC2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7	PC 8	PC 9	PC 10	PC 11	PC 12	PC 13	PC 14
Linfócitos	28,8	33	16,1	14	40,5	22,1	3,6	16,2	11,3	25,1	31,6	13,8	19,8	14
Linfócitos CD3+	68,6	68,1	64,7	65,8	73,6	62,6	64,7	73,5	79,9	60,5	81,9	55,9	75,4	55,9
Linfócitos CD56+	11,2	4,3	8,3	10,4	6,7	10,7	19,8	18	15,5	19,3	10	22,4	23,7	27,7
Linfócitos B CD19+	4,6	11,9	37	30,4	35,9	31,3	16,4	5,3	2,1	7,6	5,6	13,1	5,5	14
Linfócitos CD3+CD8+	13,7	18,3	7,2	7,3	8,5	5	6,3	36	27,1	27,3	46,5	13,8	24,3	38,3
Linfócitos CD3+CD4+	74	74,6	99,9	99,9	99,9	76,7	86,7	63,3	69,5	72,1	53,2	82,5	72,3	56,5
CD69 em linfócitos B CD19+	9,3	16,2	58,3	55,5	61,8	5,5	3,9	41	24,7	86,4	43,2	59,2	20,2	49,9
CD69 em linfócitos CD3+CD4+	3,4	8,5	69,8	72,4	72	13,9	18,8	18,6	12,9	46,3	36,3	47,7	15,3	42,9
CD69 em linfócitos CD3+CD8+	4,8	9,5	73,3	75,3	72,5	14,2	19,7	11,5	11,2	37,7	29,4	40,2	13,3	35,4

PC = paciente

Tabela A7 – Valores individuais em porcentagem dos subgrupos de linfócitos nos voluntários

Grupos celulares	VT1	VT2	VT 3	VT 4	VT 5	VT 6	VT 7	VT 8	VT 9	VT 10	VT 11	VT 12	VT 13	VT 14
Linfócitos	30,9	38	27,6	21,6	23,2	23,6	34,5	23,9	22	22,3	24,9	26,1	31	33,5
Linfócitos CD3+	43	74,4	59,2	67,2	72,2	74,1	69,8	77,7	67,7	42,1	66	58,4	38,3	63,3
Linfócitos CD56+	4,8	8,6	6,6	10,4	3,21	2,7	21,4	1,5	1	12,6	3,4	18	10,1	5,1
Linfócitos B CD19+	10,9	12,6	7,1	9	13,5	14,5	8,5	6,4	14,4	11,7	13,9	14	10,1	15,5
Linfócitos CD3+CD8+	18,9	24	48,9	45,4	57,1	34,8	51,2	59,1	21,3	18,8	17,5	31,5	19,1	17,6
Linfócitos CD3+CD4+	80,1	71,8	63,4	49,3	51,6	61,1	45,6	43	67,2	70,4	63,7	62,6	67,4	47,9
CD69 em linfócitos B CD19+	22	17,6	3,6	32,4	4,3	2,6	35,8	1,5	25,8	13,4	21,5	37,6	26,5	22,6
CD69 em linfócitos CD3+CD4+	9,4	13,8	11,1	9	8,7	5,6	24,1	8,3	35,7	24,3	26,3	24,3	38,3	20,9
CD69 em linfócitos CD3+CD8+	9,6	9,6	8,9	8,1	7,5	6,1	22,6	7,6	33	20,7	22,2	19,9	32,6	17,3

VT = voluntário

Tabela A8 – Valores individuais em porcentagem dos subgrupos de granulócitos nos pacientes

Grupos celulares	PC 1	PC2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7	PC 8	PC 9	PC 10	PC 11	PC 12	PC 13	PC 14
Granulócitos	64,6	62,4	78,5	75	46,4	65,4	88,9	73,3	82	68,7	63,5	80,2	76,7	81,3
Granulócitos CD66b+	87,8	88,3	94,1	92,4	94,2	78,3	46	75,5	77,3	77,9	72,6	79,4	64,8	76,6
Granulócitos CD66b+CD16+	97,6	94,5	96,5	96,4	91,8	99,2	98,2	89,1	88,2	99,5	86,4	97,4	89,2	84,8
Granulócitos CD66b+CD16+CD11a+	71,7	58	99,6	99,8	99,9	99,9	99,9	99,6	100	97,5	99,7	100	94,2	99,9
Granulócitos CD66b+CD16-	2,4	5,5	3,5	3,6	8,2	0,9	1,8	10,9	11,8	0,5	13,6	2,6	10,8	15,2
Granulócitos CD66b+CD16- CD11a+	34	53,1	79,1	83,7	95,1	94,2	98,3	98,8	99,8	93,4	98,9	100	87,7	100

PC = paciente

Tabela A9 – Valores individuais em porcentagem dos subgrupos de granulócitos nos voluntários

Grupos celulares	VT1	VT2	VT 3	VT 4	VT 5	VT 6	VT 7	VT 8	VT 9	VT 10	VT 11	VT 12	VT 13	VT 14
Granulócitos	69	13,6	70,4	7,4	73,8	70,5	61,3	66,9	73,1	74,5	69,9	59,6	63,2	65,7
Granulócitos CD66b+	89	86,4	92,5	87,5	93,4	91,8	33,7	91,4	86,5	90,2	92,4	61,6	87,5	84,4
Granulócitos CD66b+CD16+	66,2	73,7	94,8	71,4	97,3	97	70,5	91,7	96,9	98	97	45,6	95,2	98,5
Granulócitos CD66b+CD16+CD11a+	63,6	64,3	99,5	40	99,6	99,9	99,4	99,7	99,7	99,6	99	100	96,7	98,8
Granulócitos CD66b+CD16-	33,8	26,3	5,2	28,6	2,7	3	29,5	8,3	3,2	2	3	54,4	4,8	1,5
Granulócitos CD66b+CD16- CD11a+	70,2	40	98,7	93,7	99,1	99,7	97,3	98,8	99,3	98,6	92,8	100	95,4	96,6

VT = voluntário

Tabela A10 – Valores individuais em porcentagem dos subgrupos de monócitos nos pacientes

Grupos celulares	PC 1	PC2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7	PC 8	PC 9	PC 10	PC 11	PC 12	PC 13	PC 14
Monócitos	64,6	61,9	77,6	76,7	47,4	60,2	60,2	75,6	82,3	69,7	64,8	77,1	76,4	79,5
Monócitos CD14+	20,4	8,9	86,3	87,2	95,9	28,7	8,08	9,5	3,7	9,8	5,1	11,6	10,1	7,5
Monócitos CD14+CD86+	46,4	83,5	90	79,7	65	68,2	92	90,9	96,4	96,8	97,8	99,6	99,9	99,9

PC = paciente

Tabela A11 – Valores em porcentagem dos subgrupos de monócitos nos voluntários

Grupos celulares	VT1	VT2	VT 3	VT 4	VT 5	VT 6	VT 7	VT 8	VT 9	VT 10	VT 11	VT 12	VT 13	VT 14
Monócitos	70,6	57,2	71,4	73,7	73,8	73,2	58,8	67,6	75,1	75,8	71	60,2	64,2	66,6
Monócitos CD14+	9,9	10,3	5,5	5,3	5,5	8,3	9,1	6,3	12,6	7,9	5,8	5,5	16,7	11
Monócitos CD14+CD86+	84	98,5	93,1	99,2	91,2	69	99,6	61,7	75,9	83,7	57,2	96	82,1	89,3

VT = voluntário

Tabela A12 – Valores individuais em MFI dos subgrupos de linfócitos, granulócitos e monócitos nos pacientes

Grupos celulares	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7	PC 8	PC 9	PC 10	PC 11	PC 12	PC 13	PC 14
MFI CD69 em linfócitos CD3+CD4+	121	143	714	755	774	131	163	159	112	431	328	442	133	396
MFI CD69 em linfócitos CD3+CD8+	113	127	738	759	763	113	146	110	115	361	311	405	162	356
MFI CD69 em linfócitos B CD19+	79,6	202	621	591	662	358	395	409	251	1872	454	811	221	522
MFI CD56 em linfócitos	219	203	212	171	120	153	190	238	241	188	218	291	316	316
MFI CD11a em granulócitos CD66b+CD16+	113	51,6	1319	1516	1893	1092	1139	2069	2613	1996	1996	3327	2293	2793
MFI HLA-DR em granulócitos CD66b+CD16+	139	115	129	114	202	281	145	112	148	139	122	98	156	132
MFI CD16 em granulócitos CD66b+	5047	3078	4936	5486	40762	38345	32639	48423	46705	66648	45806	97513	71838	68335
MFI CD11a em granulócitos CD66b+CD16-	856	1146	2121	2351	3236	1689	2541	1985	2175	1611	1708	2912	1893	2591
MFI CD86 em monócitos CD14+	1898	2880	4855	3272	2444	2485	4178	3517	4132	4922	4669	5799	6286	6832

PC = paciente

Tabela A13 - Valores individuais em MFI dos subgrupos de linfócitos, granulócitos e monócitos nos voluntários

Grupos celulares	VT1	VT2	VT 3	VT 4	VT 5	VT 6	VT 7	VT 8	VT 9	VT 10	VT 11	VT 12	VT 13	VT 14
MFI CD69 em linfócitos CD3+CD4+	147	86,7	190	98,8	164	145	214	181	271	196	196	212	324	162
MFI CD69 em linfócitos CD3+CD8+	124	95,8	177	132	145	153	247	174	281	200	187	245	306	164
MFI CD69 em linfócitos B CD19+	243	174	172	312	150	120	369	112	216	148	189	384	255	233
MFI CD56 em linfócitos	238	178	67,3	155	48	38	214	47,6	49,1	90,4	39,7	165	106	48,8
MFI CD11a em granulócitos CD66b+CD16+	2994	4442	3586	5132	3823	2527	5979	2345	2694	3019	2236	3931	3113	3760
MFI HLA-DR em granulócitos CD66b+CD16+	740	1089	2994	925	2824	3027	2293	2701	2888	2606	2218	2620	2717	2338
MFI CD16 em granulócitos CD66b+	139	115	135	150	187	186	114	118	171	145	112	156	144	128
MFI CD11a em granulócitos CD66b+CD16-	1541	20018	32912	13418	44181	59971	67580	57205	58005	52194	27172	45806	25561	53219
MFI CD86 em monócitos CD14+	89,9	865	2732	668	2864	3044	1974	2274	2613	2280	1806	2584	2732	2151

VT = voluntário