



**Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

**Eduardo Arthur Rodvalho Alves**

**Avaliação da expressão dos receptores e produção de citocinas em células natural killer (NK) obtidas do sangue periférico de pacientes com lesões neoplásicas tratadas com Interferon alfa-2b peguilado**

**Uberaba-MG**

**2016**

Eduardo Arthur Rodovalho Alves

Avaliação da expressão dos receptores e produção de citocinas em células natural killer (NK) obtidas do sangue periférico de pacientes com lesões neoplásicas tratadas com interferon alfa-2b peguado

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

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

**Co-orientador:** Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

Uberaba-MG

2016

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

A478a Alves, Eduardo Arthur Rodovalho  
Avaliação da expressão dos receptores e produção de citocinas em células natural killer (NK) obtidas do sangue periférico de pacientes com lesões neoplásicas tratadas com Interferon alfa-2b peguilado / Eduardo Arthur Rodovalho Alves. -- 2016.  
84 f. : il., fig., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2016  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Antoniazi Michelin  
Coorientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta

1. Neoplasia intraepitelial cervical. 2. Interferon. 3. Células matadoras naturais 4. Imunoterapia. I. Michelin, Márcia Antoniazi. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 618.146

Eduardo Arthur Rodovalho Alves

Avaliação dos receptores e produção de citocinas em células natural killer (NK) obtidas do sangue periférico de pacientes com lesões neoplásicas tratadas com Interferon alfa-2b peguilado

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Humana”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

03 de fevereiro de 2016.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Antoniazi Michelin  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosekeila Simões Nomelini  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Prof. Dr. Victor Hugo de Melo  
Universidade Federal de Minas Gerais

*Dedico este trabalho à Deus grande fonte de força  
e inspiração, a minha família e aos meus pais pelo  
incentivo e apoio nesta caminhada.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço profundamente a minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Antoniazi Michelin e ao Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta por terem me dado a oportunidade de retomar os estudos e alavancar meus conhecimentos. Obrigado pela dedicação e sábias orientações fazendo me tornar uma pessoa melhor, vocês são exemplos a seguir por toda a vida.

Aos meus amigos e companheiros do Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON), Carolina, Poliana, Jéssica, Renata, Angela, Larissa, Tauana, Ananda, Isabela, Millena, Douglas, Thiago, Chamberttan, Bruno, André, Fabiano, Rafael e Lázaro obrigado por contribuir e colaborarem para que as tarefas do cotidiano fossem tão prazerosas. Em especial à Letícia Montes, Alessandra Cunha vocês são grandes fontes inspiradoras de força, perseverança e bondade.

Aos técnicos Claudio, Andjara e Luan por sempre nos socorrer nas horas de aperto e desespero.

Ao Dr. Marco Aurélio Trovó pelo auxílio na coleta das amostras para este trabalho e zelo ao tratar as pacientes.

À minha família que sempre me dedicou apoio e inestimável amor em cada momento da minha vida.

A minha esposa Ana Claudia e meu filho Eduardo Filho que são a base para que eu procure a cada dia me aperfeiçoar além de aprender que as pequenas coisas é que são de grande valia.

A FAPEMIG – Fundo de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais pelo apoio financeiro.

*“E não vos conformeis com este século, mas transformai-vos pela renovação da vossa mente, para que experimenteis qual seja a boa, agradável e perfeita vontade de Deus.”*

*Romanos 12;2*

## RESUMO

Em busca de tratamentos a fim de minimizar procedimentos invasivos e diminuir os riscos relacionados ao parto prematuro ou problemas obstétricos, novas abordagens terapêuticas têm recebido grande atenção para a cura das lesões cervicais em pacientes em idade reprodutiva, bem como para propor novas terapias menos invasivas. Os interferons que são glicoproteínas com efeito imunomodulador, antiviral, antiangiogênico e antiproliferativo tornou-se muito utilizado para este fim. Muitos estudos têm demonstrado o efeito antitumoral dos interferons, induzindo respostas imunológicas efetivas. Em uma infecção por vírus oncogênico do HPV de alto risco, o sistema imune desencadeia vários mecanismos de combate, entretanto, células modificadas por este vírus podem se evadir desta resposta. Estimular o sistema imunológico tornando-o capaz de reconhecer estas células modificadas ou infectadas, tem sido um grande desafio. Portanto, neste estudo, procuramos verificar o papel das células Natural Killer sistêmicas frente ao tratamento com IFN- $\alpha$  2b peguilado exógeno em pacientes com lesões neoplásicas NICs II e III. Realizamos a análise, por citometria de fluxo, dos receptores NKT, NKG2D, KIR, CD30, citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10, moléculas de adesão CD50, CD54, CD102 e coestimulatórias CD80, CD86 responsivas sistemicamente ao tratamento, no sangue periférico destas pacientes. Os Grupos Pré-tratadas, 3<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> Aplicação Geral foram comparados por 1 way ANOVA Friedman test e teste de Dunn's Múltiplas comparações, e os Grupos Pré-tratadas, 3<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> Aplicação Boa e Má Resposta foram analisados e comparados pela mediana dos resultados utilizando Mann-Whitney test para amostras de frequência não pareadas considerando significativos os resultados de p menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ). Os nossos resultados mostraram-se significativos, para os receptores NKT ( $p=0,0263/p=0,0434$ ), CD50 ( $p=0,0205$ ) e CD80 ( $p=0,0205$ ), e os demais marcadores não demonstraram significância estatística entre os grupos analisados. Contudo concluímos que a má responsividade sistêmica ao tratamento possa estar associada ao aumento das células NKT invariáveis, as moléculas de adesão CD50 e coestimulatórias CD80, visto que, pacientes que obtiveram má resposta a imunoterapia apresentaram maior intensidade de



fluorescência destes perfis no início e terceira aplicação do tratamento, sugerindo, portanto, que as funções do sistema imune.

**Palavras-chave:** Interferon alpha, células NK, imunoterapia, neoplasia intraepitelial cervical.

## ABSTRACT

Seeking treatments to minimize invasive proceeding and reduce the risks related to premature birth or obstetrical problems, new therapeutic approaches have received great attention for the healing of cervical lesions in patients of reproductive age, and to propose new therapies, less invasive. The interferons are glycoproteins with immunomodulatory effect, antiviral, antiproliferative and antiangiogenic became widely used for this purpose. Many studies have demonstrated the antitumor effect of interferons, inducing effective immune responses. In an oncogenic virus infection of high-risk HPV, the immune system triggers multiple fighting mechanisms, however, modified cells by this virus can evade this response. Stimulate the immune system making it able to recognize these modified or infected cells has been a major challenge. Therefore, in this study, we assessed the role of natural killer cells against the systemic treatment with IFN- $\alpha$  2b exogenous pegylated in patients with neoplastic lesions NICs II and III. We performed the analysis, by flow cytometry, of receptors NKT, NKG2D, KIRs, CD30, cytokines IFN- $\gamma$ , IL-10, adhesion molecules CD50, CD54, CD102 and co-stimulatory CD80, CD86 responsive systemic treatment, in the peripheral blood of these patients. The groups general Pre-treated, 3rd, 6th Application were compared by 1 way ANOVA Friedman test and Dunn test's Multiple comparisons, and the groups Pre-treated, 3rd, 6th Application Good and Bad response were analyzed and compared by the median of the results using Mann-Whitney test for unpaired samples often significant considering the results of p lower than 0.05 ( $p < 0.05$ ). Our results were significant for the NKT receptors ( $p = 0.0263$  /  $p = 0.0434$ ), CD50 ( $p = 0.0205$ ) and CD80 ( $p = 0.0205$ ), and other markers did not show statistical significance among the groups. However concluded that poor systemic responsiveness to treatment may be associated with increased invariant NKT cells, adhesion molecules CD50 and co-stimulatory CD80, since patients who were poor response to immunotherapy showed a higher fluorescence intensity of these profiles at the beginning and third application treatment suggesting therefore that the functions of the immune system.

**Keywords:** Interferon alpha, NK cells, immunotherapy, cervical intraepithelial neoplasia.

## LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Resposta imune inata e ativação de respostas imunes adaptativas	<b>6</b>
<b>Figura 2</b> – Subtipos de células NK humanas.....	<b>8</b>
<b>Figura 3</b> – Vias de sinalização do interferon.....	<b>11</b>
<b>Figura 4</b> - Esquema de Tratamento das Pacientes .....	<b>20</b>
<b>Figura 5</b> - Procedimentos realizados na execução da citometria de fluxo .....	<b>24</b>
<b>Gráfico 1</b> - Gráfico percentual de células NG2D/IFN- $\gamma$ .....	<b>28</b>
<b>Gráfico 2</b> - Gráfico percentual de células NKG2D/IL-10.....	<b>29</b>
<b>Gráfico 3</b> – Gráfico percentual de células NKG2D/CD30 .....	<b>29</b>
<b>Gráfico 4</b> - Gráfico percentual de células NKT/CD30 .....	<b>30</b>
<b>Gráfico 5</b> - Gráfico percentual de células CD102/CD50 .....	<b>30</b>
<b>Gráfico 6</b> - Gráfico percentual de células CD54/CD50 .....	<b>31</b>
<b>Gráfico 7</b> - Gráfico percentual de células CD86/CD80 .....	<b>31</b>
<b>Gráfico 8</b> – Gráfico da intensidade de fluorescência NKT .....	<b>32</b>
<b>Gráfico 9</b> – Gráfico da Intensidade de fluorescência NKG2D.....	<b>33</b>
<b>Gráfico 10</b> – Gráfico da intensidade de fluorescência KIRNKT .....	<b>34</b>
<b>Gráfico 11</b> – Gráfico da intensidade de fluorescência IFN- $\gamma$ .....	<b>34</b>
<b>Gráfico 12</b> – Gráfico da intensidade de fluorescência IL-10.....	<b>35</b>
<b>Gráfico 13</b> – Gráfico da intensidade de fluorescência CD50 .....	<b>35</b>
<b>Gráfico 14</b> – Gráfico da intensidade de fluorescência CD54 .....	<b>36</b>
<b>Gráfico 15</b> – Gráfico da intensidade de fluorescência CD80 .....	<b>36</b>
<b>Gráfico 16</b> – Gráfico da intensidade de fluorescência CD86.....	<b>37</b>
<b>Gráfico 17</b> - Gráfico da intensidade de fluorescência CD102.....	<b>37</b>

## LISTA DE TABELAS

<b><i>Tabela 1</i></b> - Características clínicas das pacientes selecionadas para o estudo	<b>21</b>
<b><i>Tabela 2</i></b> - Marcações Extra e Intracelulares para as células NK.....	<b>23</b>
<b><i>Tabela 3</i></b> - Diagnóstico e número de pacientes selecionadas para o estudo ...	<b>27</b>
<b><i>Tabela 4</i></b> - Relação das pacientes selecionadas do Grupo Boa Resposta .....	<b>27</b>
<b><i>Tabela 5</i></b> - Relação das pacientes selecionadas do Grupo Má Resposta .....	<b>27</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- WHO** – World Health Organization
- HPV** – Papilomavírus humano
- INCA** – Instituto Nacional do Câncer
- NIC** – Neoplasia Intraepitelial Cervical
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- TBS** – The Bethesda System
- LSIL** – Lesão intraepitelial de Baixo Grau
- HSIL** – Lesão intraepitelial de Alto Grau
- SI** – Sistema Imune
- IFN-TI** – Interferons do Tipo I
- IFN-TII** – Interferons do Tipo II
- IFN-TIII** – Interferons do Tipo III
- MHC/CHP** – Complexo principal de histocompatibilidade
- HLA** – Antígeno Leucocitário Humano
- CD4** – Linfócitos T auxiliares
- CD8** – Linfócitos T citolíticos
- Th1** – Subtipo de linfócito auxiliar do perfil 1
- Th2** – Subtipo de linfócito auxiliar do perfil 2
- IL** – Interleucina
- TNF** – Fator de necrose tumoral
- IFN- $\gamma$**  – Interferon gama
- NK** – Células Natural Killer
- NKT** – Células natural killer expressando receptor de célula T
- iNKT** – Células natural killer T invariáveis
- T $\gamma\delta$**  – Células T gama delta
- CD** – Cluster of Differentiation
- ADCC** – Citotoxicidade Dependente de Anticorpos
- IFNAR 1** – Receptor 1 de ativação de interferon
- IFNAR 2** – Receptor 2 de ativação de interferon
- Jak** – Janus quinase
- Tyk** – Tirosina quinase
- PCR** – Reação em cadeia da polimerase

**CAF** – Cirurgia de alta frequência

**LEEP** – Procedimento de excisão eletrocirúrgica

## LISTA DE SIGLAS

**KIR** – Receptores Killer semelhante a Imunoglobulina

**NKG2** – Receptores da Família Semelhante à Lectina C

**MIC** – Proteína expressa minimamente em tecidos normais

**NKp** – Receptores pertencente a superfamília das Imunoglobulinas

**dim** – Capacidade de maior fluorescência

**bright** – Capacidade de menor fluorescência

**STAT** – Proteína transdutora de sinais e ativadores da transcrição

## SUMÁRIO

**AGRADECIMENTOS**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES**

**LISTA DE TABELAS**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**LISTA DE SIGLAS**

**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1 – O câncer de colo uterino .....	01
1.2 – Carcinogênese e neoplasia intraepitelial cervical .....	02
1.3 – Resposta imune e Neoplasias .....	04
1.4 – Células Natural Killer .....	06
1.5 – Interferons.....	09
1.6 – Tratamento e Imunoterapias.....	12
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
3.1 – Objetivos Gerais .....	17
3.2 – Objetivos Específicos.....	17
<b>4. PACIENTES &amp; MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
4.1 – Casuística .....	19
4.2 – Dados Clínicos.....	21
4.3 – Coleta do Sangue Periférico .....	22
4.4 – Análise por Citometria de Fluxo .....	22
4.5 – Análise dos resultados.....	25
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
5.1 – Delineamento do estudo .....	27
5.2 – Avaliação dos receptores, citocinas, moléculas de adesão e coestimulatórias .....	28
5.3 – Avaliação da intensidade de fluorescência dos receptores, citocinas moléculas de adesão e coestimulatórias .....	32



<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>55 – 68</b>

# *1 Introdução*

## INTRODUÇÃO

### 1.1 O CÂNCER DE COLO UTERINO

1 O câncer é uma das maiores causas de morte no mundo. Publicações da  
2 World Health Organization, apontam o câncer de colo uterino como o terceiro  
3 que mais acomete as mulheres e o segundo de maior prevalência, mundialmente  
4 (WHO, 2015).

5 Estima-se que cerca de 450.000 mulheres em todo o mundo sejam infectadas  
6 pelo HPV e desenvolvam o câncer cervical, e aproximadamente 270.000 morram  
7 anualmente devido ao avanço da doença (BRESTOVAC et al., 2013;  
8 MATSUKURA; SUGASE, 2008).

9 No Brasil, o cancer de colo uterino é a terceira doença com maior incidência.  
10 Em Minas Gerais, a estimativa é de 10 novos casos a cada 100 mil habitantes,  
11 tornando-a a quarta região de maior incidência no ranking de classificação entre  
12 as regiões no país (INCA, 2014).

13 Através da implementação de programas de controle da doença por métodos  
14 de triagem efetiva e tratamento terapêutico adequado, pode-se obter  
15 significativas reduções dos números publicados (BURD, 2003).

16 Um dos métodos diagnósticos das neoplasias cervicais mais utilizado é o  
17 exame citológico de Papanicolaou, servindo também para prevenir a doença  
18 (CUZICK et al., 2006; KOUTSKY, 1997). A colposcopia é um método auxiliar  
19 para detectar sinais importantes da infecção pelo *Papilomavírus Humano* (HPV),  
20 confirma anormalidades observadas na citologia do material cervical coletado,  
21 como: epitélio aceto branco espesso, formação de vasos sanguíneos atípicos e  
22 não visualização da junção escamo colunar em sua execução. A coleta de  
23 biopsia direta da lesão e a colposcopia são considerados como referências na  
24 investigação de lesões pré-cancerígenas (BELINSON et al., 2001; SAUVAGET  
25 et al., 2011).

26 Atualmente, discute-se quanto ao programa de vacinação adotado como  
27 medida profilática na redução do câncer cervical. Questões como a efetividade  
28 do tratamento e o custo benefício são relevantes (JANE J. KIM, PH.D., AND SUE  
29 J. GOLDIE, M.D., 2008).

30 Cerca de 95% das lesões invasivas de colo uterino são sustentadas pela  
31 infecção associada ao *Papilomavírus Humano* (BOSCH; QIAO;  
32 CASTELLSAGUE, 2006). Entretanto, outros fatores contribuem para o  
33 desenvolvimento da carcinogênese, dentre eles, estudos relacionam o tipo de  
34 HPV causador da infecção associado a infecções por *Chlamydia trachomatis*,  
35 tabagismo, início precoce da atividade sexual, multiplicidade de parceiros  
36 sexuais, multiparidade, uso de contraceptivos orais, imunossupressão, dieta  
37 deficiente em frutas e vegetais e o baixo status socioeconômico (BOSCH;  
38 MUÑOZ; SANJOSÉ, 1997; KJAER et al., 1998; KOUTSKY, 1997; MUÑOZ,  
39 2000).

40 Estudos revelaram que durante a fase secretória do ciclo menstrual há uma  
41 janela de vulnerabilidade, onde componentes importantes, como as células da  
42 imunidade inata, adquirida e a imunidade humoral, são reguladas por hormônios  
43 que limitam as respostas imunológicas às infecções sexualmente transmissíveis,  
44 sendo elas precursoras de neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) (WIRA et  
45 al., 2015).

46 Outro fator que contribui para a evolução e desenvolvimento de lesões  
47 cervicais, é determinado pela não realização periódica dos exames  
48 citopatológicos rotineiramente. Mas, apesar da adesão ao protocolo de  
49 investigação adequado, mulheres ainda poderão desenvolver a neoplasia  
50 (BURD, 2003; MONSONEGO et al., 2004; RIVOIRE; CAPP; CORLETA, 2001).

## 1.2 CARCINOGENESE E NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

51 A evolução e desenvolvimento do câncer caracteriza-se pelo crescimento  
52 desordenado de células que invadem tecidos e órgãos, formando um  
53 microambiente que limita interações entre células e moléculas levando a  
54 progressão tumoral (CHEN et al., 2015). Infecções causadas por vírus  
55 oncogênicos induzem a carcinogênese levando a progressão da lesão cervical  
56 (MONSONEGO et al., 2004).

57 Os casos de tipos virais mais comuns que levam ao desenvolvimento de  
58 neoplasias intraepiteliais são os tipos de HPVs carcinogênicos e oncogênicos.  
59 Os mais prevalentes em lesões cervicais são os tipos 16, 18, 45 e 31,

60 considerados como HPVs de alto risco (CASTELLSAGUÉ, 2008; MUÑOZ et al.,  
61 2003).

62 Métodos para identificação de partículas virais do HPV sofreram grandes  
63 avanços auxiliando na detecção dos vários tipos causadores da transformação  
64 neoplásica. Estudos experimentais evidenciaram que genes do DNA nuclear, ao  
65 sofrer uma mutação pela infecção viral, afetam o desenvolvimento e atividade  
66 normal da célula conduzindo, assim, a um provável desenvolvimento de lesões  
67 neoplásicas. Nesses casos, a taxa de detecção ou carga viral do DNA do HPV é  
68 de 90% nas biópsias das lesões (MICHOR; IWASA; NOWAK, 2004).

69 Prata e colaboradores (2015), sugeriram em seus achados que, quando  
70 existem altas concentrações da carga viral do HPV, a possibilidade do material  
71 genético integrar-se ao genoma do hospedeiro aumenta.

72 As lesões na infecção por HPV oncogênico, dos tipos 16, 18, 45 ou 31, sofrem  
73 eventos de progressão, que se caracterizam por maturação anormal levando à  
74 atipias celulares de graus variáveis. Essas lesões de acordo com a classificação  
75 de Richart dividem-se em 3 tipos: NIC I (Displasia Leve), NIC II (Displasia  
76 Moderada) e NIC III (Displasia Grave) (SHINGLETON et al., 1968). Entretanto,  
77 após esta nomenclatura, simpósios com a finalidade de padronização da nova  
78 classificação foram realizados e, em 2001 foi introduzida uma nova terminologia  
79 determinando que lesões NIC I, NIC II e NIC III fazem parte da mesma interação  
80 biológica, porém, são originadas de diferentes estágios da doença (SOLOMON,  
81 2002). Esta nova terminologia, “The Bethesda System” (TBS), baseou-se nos  
82 dados dos achados citológicos, podendo também ser utilizada para caracterizar  
83 cortes histológicos devido a inclusão do grau da lesão e o tipo de epitélio  
84 encontrado.

85 Desta forma, a classificação foi dividida em dois modos de lesões  
86 intraepiteliais escamosas, as de baixo grau (LSIL) correspondentes a NIC I e  
87 alterações causadas pelo HPV, e as lesões escamosas de alto grau (HSIL)  
88 correspondentes as NIC II e III de acordo com os achados histológicos e os  
89 diferentes graus de diferenciação celular. Entretanto, o TBS criou uma  
90 classificação para atipias escamosas de significado indeterminado que foram os  
91 termos ASC-US, mas, se encontrado células escamosas atípicas, o termo ASC-  
92 H foi introduzido afim de que não se exclua a possibilidade de lesão de alto grau

93 (ELSHEIKH; KIRKPATRICK; WU, 2006; NAYAR; WILBUR, 2015; SOLOMON,  
94 2002).

95 A infecção pelo HPV nas mulheres é comum, entretanto, lesões pré-  
96 neoplásicas do colo uterino na maioria das vezes são assintomáticas,  
97 inaparente, de caráter transitório, de regressão espontânea, e somente algumas  
98 lesões progridem para o carcinoma invasivo (BOCCARDO; LEPIQUE; VILLA,  
99 2010; KLAES et al., 1999; STEBEN; DUARTE-FRANCO, 2007).

100 Estima-se que o precursor para a regressão das lesões em mulheres  
101 infectadas seja o sistema imunológico, mas seus mecanismos específicos ainda  
102 não foram completamente elucidados (PINTO; TULIO; CRUZ, 2002).

### 1.3 A RESPOSTA IMUNE E NEOPLASIAS

103 O sistema imune (S I) utiliza a imunidade inata e adaptativa para reconhecer  
104 e eliminar agentes patogênicos que invadem o nosso corpo. Basicamente ele  
105 deve reconhecer e destruir clones de células modificadas antes que se  
106 transformem em células tumorais, utilizando de vários mecanismos para eliminá-  
107 las o que o torna de suma importância para o combate ao câncer (BOCCARDO;  
108 LEPIQUE; VILLA, 2010).

109 As principais células responsáveis e envolvidas na resposta imune à  
110 patógenos e células tumorais são as células apresentadoras de antígeno,  
111 compreendendo as células dendríticas, monócitos, macrófagos e células NK que  
112 fazem parte da imunidade inata, os linfócitos T auxiliares e T citotóxicos que  
113 reconhecem e eliminam patógenos formando a imunidade adaptativa e os  
114 linfócitos B a imunidade humoral. (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

115 A imunidade inata, primeira linha de defesa contra infecções patogênicas, e  
116 células tumorais, recrutam células que são estimuladas a produzir citocinas e  
117 moléculas quimioatraentes capazes de estimular respostas imunes efetoras  
118 através da imunidade adaptativa (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015).

119 Os sinais gerados pela imunidade inata identificam a natureza do antígeno e  
120 o tipo de resposta através de receptores codificados para reconhecer alvos  
121 moleculares essenciais para a sobrevivência microbiana, que são chamados de  
122 padrões moleculares associados ao patógeno, conhecidos por receptores  
123 semelhantes a Toll (Toll-like receptors) (STANLEY, 2006).

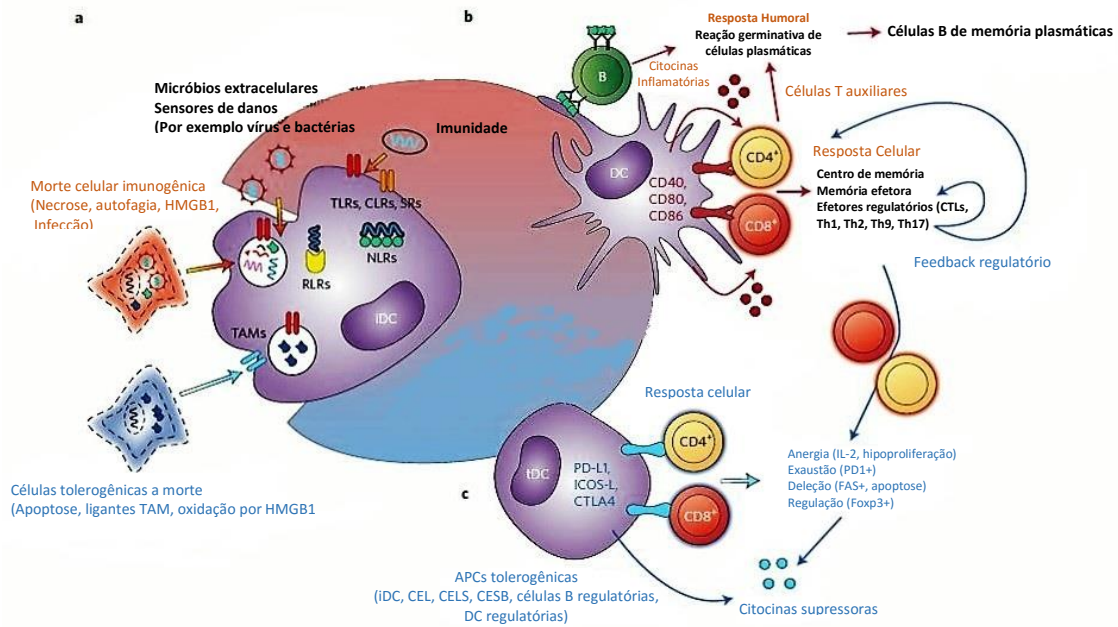
124 As células danificadas geneticamente ou infectadas, quando reconhecidas  
125 pela imunidade inata, são conduzidas ao sistema imune adaptativo pelas células  
126 dendríticas que dependem da produção de interferon do tipo I (IFN-TI) para  
127 serem estimuladas. Uma vez estimuladas, estas células podem reconhecer  
128 patógenos ou antígenos associados ao tumor, e apresentá-los as células TCD8  
129 (FIGURA 1) (IRVINE; SWARTZ; SZETO, 2013).

130 Os linfócitos T reconhecem antígenos que são processados em pequenos  
131 peptídeos ligados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC)  
132 presentes na superfície da membrana celular. Existem dois subtipos de células  
133 T, identificadas por marcadores de superfície CD4 ou CD8. As células TCD4<sup>+</sup>  
134 reconhecem antígenos pela via de processamento do MHC de classe II, e células  
135 T CD8<sup>+</sup>, reconhecem antígenos apresentados pela via do MHC de classe I.  
136 Geralmente esses antígenos são derivados da síntese intracelular de proteínas  
137 quebradas no proteassoma e exibidas em pequenos peptídeos que são  
138 apresentados pelo complexo MHC (STANLEY, 2006).

139 A ativação de células T CD4<sup>+</sup> resulta na secreção de citocinas que ajudam e  
140 regulam outras células. O padrão de citocina expressa define o tipo de resposta  
141 e o perfil celular predominante. As células Th2, subtipos de linfócitos TCD4<sup>+</sup> que  
142 produzem principalmente IL-4 e IL-10 auxiliam linfócitos B a se diferenciar em  
143 plasmócitos secretores de anticorpos em um primeiro contato com o antígeno. O  
144 perfil Th1 outro subtipo de linfócito TCD4<sup>+</sup>, secretam Interferon gama (IFN- $\gamma$ )  
145 criando um ambiente propício para respostas citotóxicas efetoras, onde  
146 macrófagos, células natural killer e linfócitos T CD8<sup>+</sup> são ativados gerando a  
147 imunidade mediada por células (IGNEY; KRAMMER, 2002).

148 Dentre os mecanismos clássicos de respostas imunes efetoras, alguns  
149 tumores têm mostrado a presença de células NK, esta infiltração associou um  
150 prognóstico favorável em pacientes com câncer. Estudos observaram a  
151 presença de células NKT e células T $\gamma\delta$ , mas ainda suas funções específicas não  
152 estão bem estabelecidas. Uma explicação plausível para estes achados, é que  
153 células do sistema imune inato contribuem positivamente no controle antitumoral  
154 (WOO; CORRALES; GAJEWSKI, 2015).

Figura 1 – Resposta imune inata e ativação de respostas imunes adaptativas



Adaptado de: (IRVINE; SWARTZ; SZETO, 2013)

#### 1.4 CÉLULAS NATURAL KILLER

155 Ao realizar experimentos em camundongos, Kiessling, Klein e Wigzell em  
 156 1975 descobriram uma terceira classe de linfócitos com morfologia diferente a  
 157 dos linfócitos T e dos linfócitos B com grande atividade citolítica contra células  
 158 tumorais de uma linhagem leucêmica, e as chamaram de “killers cells” (células  
 159 assassinas) (VIVIER, 2006).

160 As células natural killers (NKs), originam-se de células progenitoras  
 161 hematopoiéticas (HPCs) CD34<sup>+</sup> da medula óssea, e possui morfologia  
 162 semelhante aos linfócitos grandes granulares (FARAG; CALIGIURI, 2006).

163 Estudos desde então tem focado no papel das células NKs e o seu  
 164 envolvimento na resposta imune. Sabe-se que elas podem contribuir na resposta  
 165 imune inata em defesa contra: tumores, infecções virais e outros patógenos  
 166 microbianos, mas também, podem regular e promover respostas imunes  
 167 adaptativas. As NKs possuem um repertório heterogêneo de receptores de  
 168 ativação que reagem a diferentes estímulos como: produtos microbianos,  
 169 citocinas, quimiocinas e moléculas expressas na superfície de células infectadas  
 170 e neoplásicas. Os receptores inibitórios são específicos para as moléculas do  
 171 Complexo Principal de Histocompatibilidade (CHP) de classe I desempenhando



172 papel fundamental na habilidade das células NKs em discriminar um tecido  
173 próprio e não próprio (JAEGER; VIVIER, 2012; LANIER, 2003).

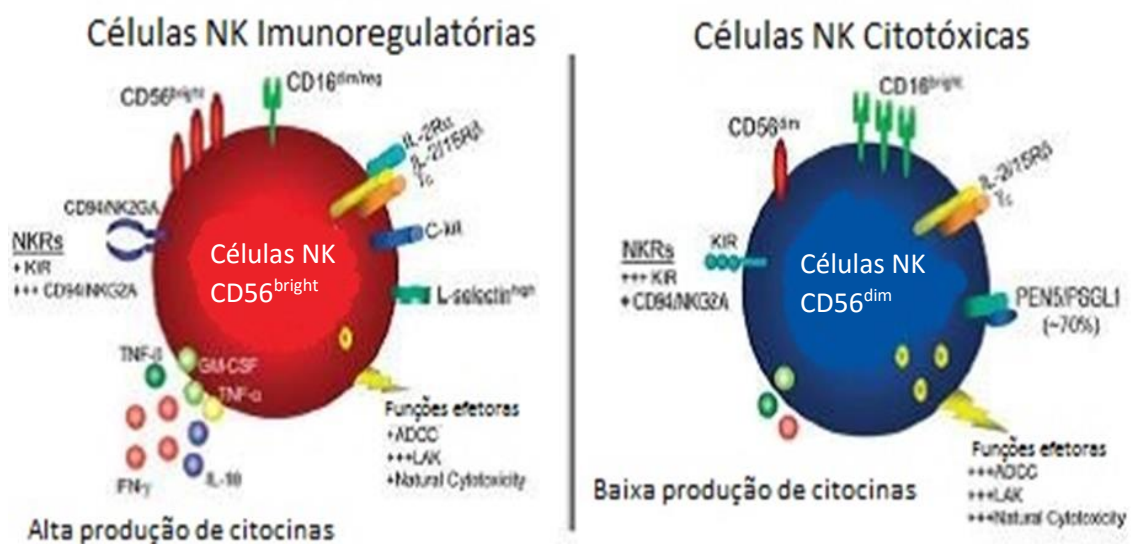
174 Os receptores inibitórios são divididos em 2 grupos: os receptores do tipo I  
175 que incluem KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptors) e os LILRs (Leukocyte  
176 Immunoglobulin-like Receptors) que são glicoproteínas monoméricas  
177 pertencentes à superfamília das imunoglobulinas (Igs) e os do tipo II, que  
178 também são glicoproteínas da família de receptores semelhantes à lectina C  
179 (FARAG; CALIGIURI, 2006). Os receptores da família semelhante à lectina C  
180 reconhecem moléculas de Antígeno Leucocitário Humano (HLA) de classe I não  
181 clássicas sendo composto pelos seguintes membros: CD94, NKG2A/B que  
182 reconhecem HLA-E e fornece sinais inibitórios, e CD94/NKG2C que também  
183 reconhece HLA-E fornecendo sinais ativatórios (VIVIER; UGOLINI, 2011). Outro  
184 membro dessa família é o NKG2D humano um receptor ativador, que reconhece  
185 proteína A (MICA) e proteína B (MICB) que são codificadas por genes que fazem  
186 parte do HLA. Essas proteínas têm baixa expressão nos tecidos normais, e alta  
187 em células tumorais. Os receptores do tipo I KIR são compostos por um conjunto  
188 de receptores ativatórios e inibitórios que reconhecem moléculas de HLA-A, B e  
189 C (ANFOSSI et al., 2006; FARAG; CALIGIURI, 2006; LANIER, 2003).

190 O receptor de ativação CD16 (FcγRIIIa) liga-se à porção cristalizável (FC)  
191 das IgGs e ataca células infectadas por vírus recobertas de anticorpos (Ac)  
192 através da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). O NKp46,  
193 NKp30 e NKp44 foram recentemente descobertos e pertencem à superfamília  
194 das imunoglobulinas. O NKp44 é seletivamente expresso nas NKs em cultura  
195 com IL-2, enquanto o NKp46 é expresso em todas células NKs ativadas e  
196 anérgicas estando envolvidos na ativação da NK durante o processo de  
197 citotoxicidade natural (GARCIA-IGLESIAS et al., 2009).

198 As NKs humanas são divididas em 2 subtipos: CD56dim (90%) e CD56bright  
199 (10%). O subtipo CD56dim possuem maior atividade citotóxica e tem baixa  
200 expressão do receptor CD16 (FcγRIIIa). Já o subtipo CD56bright sintetiza maior  
201 quantidade de citocinas imunorregulatórias. Os principais antígenos utilizados  
202 como marcadores para identificar as células NKs são CD56 e CD16. O CD56 é  
203 semelhante à molécula de adesão da célula neural (NCAM) e o CD16 é expresso  
204 na maioria das células NKs, sendo um receptor para porção Fc das IgGs (FIG.  
205 2) (MORETTA, 2010; VIVIER, 2006).

206 As células NKs em anergia, apresentam receptores para o IFN- $\gamma$  além de  
 207 armazenar em seus grânulos granzimas e perforinas. Apesar de parecerem  
 208 prontas para desempenhar sua função, ainda necessitam de ativação via IFN-TI  
 209 ou via citocinas imunomoduladoras, como interleucina (IL) IL-12, IL-15 e IL-18  
 210 para tornarem-se células efetoras. Células NKs em cultura com IL-12 e IL-18 são  
 211 suficientes para iniciar a síntese de IFN- $\gamma$ , sem que haja qualquer contato do  
 212 receptor de ativação com estruturas da membrana das células infectadas,  
 213 estudos descreveram que a presença da interleucina-15 (IL-15) é um fator  
 214 determinante para o desenvolvimento das células NKs (HARLIN et al., 2007).

Figura 2 – Subtipos de células NK humanas



Adaptado de: (FARAG; CALIGIURI, 2006)

215 Além das células NK CD56<sup>dim</sup> e <sup>bright</sup>, um outro subtipo, são as células  
 216 natural killer invariantes (iNKT) que utilizam receptores de células T (TCRs) para  
 217 reconhecer auto antígenos lipídicos apresentados ao CD1d como antígenos  
 218 cognatos (BRENNAN; BRIGL; BRENNER, 2013).

219 As células iNKT são encontradas no fígado e após sua ativação produzem  
 220 IFN- $\gamma$  e IL-4, estudos de ativação das células iNKT de humanos e camundongos,  
 221 tem utilizado  $\alpha$ -GalCer para ativa-las *in vitro* e *in vivo* (GODÓ; SESSLER;  
 222 HAMAR, 2008).

223 A correlação e função destas células com as respostas imunes, inata e  
 224 adaptativa, tem sido associado ao seu envolvimento em doenças infecciosas

225 como, alergia, asma, autoimunidade e na imunovigilância a tumores. Estudos  
226 avançados de identificação e purificação de células iNKT, revelaram sua  
227 atividade em uma variedade de infecções crônicas e agudas em camundongos  
228 e humanos (JUNO; KEYNAN; FOWKE, 2012).

229 Respostas moduladas pelas células NKT podem ocorrer de duas maneiras,  
230 antígeno dependente ou independente, gerando ativação robusta dos perfis Th1  
231 e Th2, com produção de citocinas que permitem a plasticidade funcional destas  
232 células conferindo características pró-inflamatórias e imunorregulatórias (VAN  
233 KAER; PAREKH; WU, 2011).

### 1.5 INTERFERONS

234 Isaac & Lindenmann, em 1957 executando seus experimentos descobriram  
235 uma substância que havia inibido a replicação do vírus inativado ao ser aplicada  
236 em um tecido vivo, nomeando-a de Interferon (IFN), exatamente por interferir  
237 diretamente na replicação viral. Os IFNs são glicoproteínas da família das  
238 citocinas que desempenham função antiviral, imunomoduladora, participando na  
239 regulação do crescimento celular além de possuir atividade antitumoral (LASFAR  
240 et al., 2006).

241 Os IFNs são divididos em 3 tipos: os IFNs do tipo I (IFN-TI) também  
242 conhecidos como IFNs virais que incluem os: IFN-alpha (IFN- $\alpha$ ), IFN-beta (IFN-  
243  $\beta$ ), IFN-ômega (IFN- $\omega$ ), IFN-épsilon (IFN- $\epsilon$ ) e IFN-capa (IFN- $\kappa$ ); o tipo II (IFN-TII)  
244 conhecido como IFN imune, composto somente pelo IFN-gama (IFN- $\gamma$ ), e do tipo  
245 III (IFN-TIII) composto pelos IFNs-lambda (IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 e IFN- $\lambda$ 3) (LASFAR,  
246 2006; SAMUEL, 2001).

247 Os IFNs-TI são citocinas sintetizadas em resposta às infecções virais pela  
248 maioria das células e também por algumas células não infectadas que  
249 reconhecem microrganismos extracelulares através dos padrões moleculares  
250 associados a patógenos (PAMPS) (THEOFILOPOULOS et al., 2005).

251 O interferon alpha (IFN- $\alpha$ ) pertencente a uma família de proteínas restritas,  
252 possui atividade antiviral, antiproliferativa e imunorregulatória. Devido essas  
253 propriedades o IFN- $\alpha$  tem sido utilizado como terapia farmacológica no  
254 tratamento de algumas doenças virais (PARMAR; PLATANIAS, 2003).  
255 Entretanto, estudos têm demonstrado a utilização do interferon no tratamento de

256 vários tipos de câncer aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA).  
257 Pacientes tratados com IFN aumentaram o tempo de vida livre de doença, bem  
258 como as recidivas, se comparado a pacientes não tratados. Os dados obtidos  
259 pelo Eastern Cooperative Oncology Group apoiam a hipótese de que o IFN  
260 aumenta a resposta imune antitumoral. Todavia, estudos em desenvolvimento  
261 são necessários para estabelecer dosagens e o tempo de tratamento para os  
262 diversos tipos de câncer (DUNN; KOEBEL; SCHREIBER, 2006).

263 Desde 1970 os cientistas definiam os interferons como três tipos moleculares  
264 distintos dependendo especificamente do tipo celular que o secretava. Por  
265 exemplo, o IFN- $\alpha$  produzido por leucócitos infectados por vírus, o IFN- $\beta$  por  
266 fibroblastos e o IFN- $\gamma$  como promotor da polarização linfocítica, designado como  
267 interferon imune. Todavia, em estudos aprofundados descobriram que cada tipo  
268 não se restringe completamente a um grupo celular, onde leucócitos infectados  
269 por vírus que secretam IFN- $\alpha$ , podem utilizá-lo como fonte geradora de outros  
270 tipos de interferons (LASFAR, 2012).

271 Os IFNs  $\alpha$  e  $\beta$  glicoproteínas essenciais na defesa contra vírus, precisam se  
272 ligar aos receptores específicos nas células-alvo para executarem sua ação.  
273 Portanto, estudos tem demonstrado que a proteína E6 do HPV-16 de alto risco  
274 consegue se ligar ao fator 3 estimulador do interferon (IRF-3) podendo inibir sua  
275 função de ativação transcricional (RONCO et al., 1998).

276 Todos os membros dos IFNs interagem com um tipo de receptor específico  
277 que consiste de um par de unidades heterólogas e iniciam sua sinalização  
278 através da ligação ao um mesmo receptor composto de 2 subunidades IFNAR-  
279 1 e IFNAR-2. A interação ligante-receptor desencadeia a via Janus Kinases (Jak)  
280 transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT) juntamente com uma  
281 cascata de sinalização (NOVICK et al., 2000).

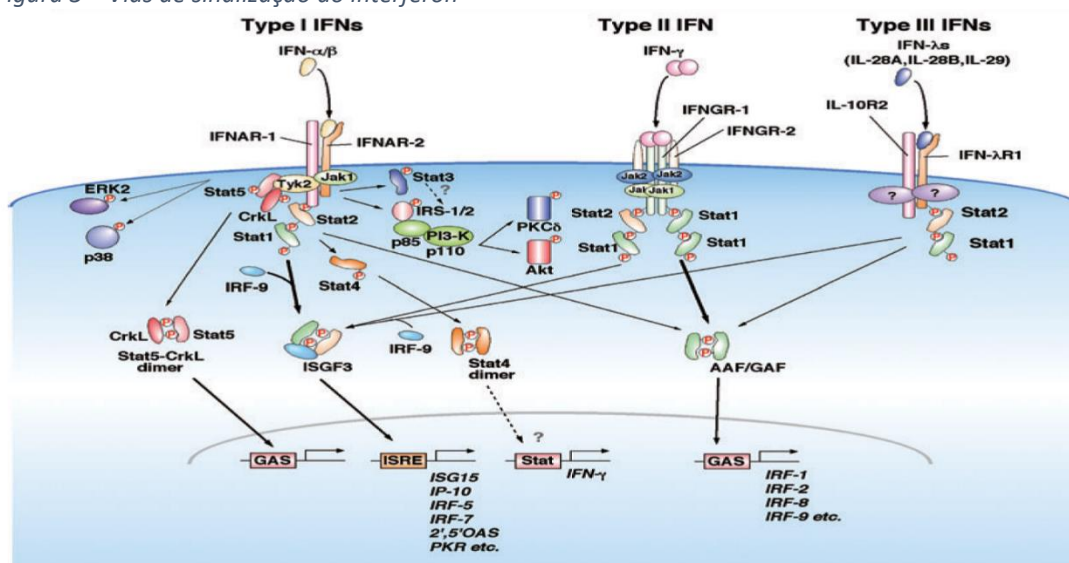
282 O IFNAR-2 é o principal receptor dos IFNs, e possui grande afinidade  
283 nanomolar para os IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ . As respostas dos IFN-TI são iniciadas por  
284 suas interações com um receptor específico de superfície celular que possui  
285 domínio extracelular ligado a uma quinase intracelular. Cada subunidade do  
286 receptor liga-se a um único membro da família JAK, o receptor IFNAR-1 liga-se  
287 a Tirosina Kinase 2 (Tyk2), e o receptor IFNAR-2 liga-se a Jak2. Esta ligação  
288 induz a fosforização da Jak2 Tyk2. Os resíduos intracelulares de tirosina da  
289 cadeia do receptor recrutam as proteínas transdutoras de sinais e ativadoras da

290 transcrição (STAT). As STATs ativadas se dissociam do receptor e migram para  
 291 o núcleo e induz a expressão do gene estimulador de interferon (ISGs) (FIG. 3)  
 292 (CHILL et al., 2003; VAN BOXEL-DEZAIRE; RANI; STARK, 2006).

293 Os Interferons-gama (IFNs- $\gamma$ ) possuem atividade antiviral e são sintetizados  
 294 por células T ativadas e células NKs, exceto por células infectadas por vírus. É  
 295 essencial para ativação de macrófagos, contribuindo para imunidade inata,  
 296 participando também do desenvolvimento de células T CD4<sup>+</sup>, células Th1 e  
 297 células T CD8<sup>+</sup>. Os IFNs- $\gamma$  se ligam aos receptores de Interferon gama 1 e 2  
 298 (IFNGR-1 e IFNGR-2) (IKEDA; OLD; SCHREIBER, 2002). Já o IFN- $\lambda$  (IFN-TIII)  
 299 recentemente foi identificado como IFN- $\lambda$  1 (Interleucina-29), IFN- $\lambda$  2  
 300 (Inteleucina-28a) e IFN- $\lambda$  3 (Interleucina-28b) (DONNELLY et al., 2004). Os IFN-  
 301  $\lambda$  se ligam a um único receptor, o IFN- $\lambda$ R1 (Receptor Interferon-lambda R1)  
 302 também chamado de Interleucina 28AR (IL-28AR) e as vias de sinalização  
 303 induzida por essa ligação é semelhante à dos IFN-TI, onde ocorre a ativação da  
 304 Janus Kinase 1 (Jak1) e Tirosina Kinase 2 (Tyk2) resultando na ativação do fator  
 305 3 estimulador do interferon (ISGF3) (LASFAR et al., 2006) (FIGURA 3).

306 Estudos em animais e humanos realizados por quase 50 anos, demonstraram  
 307 a importância do IFN no tratamento e controle do câncer. Sua propriedade  
 308 antiviral e biológica com poder de modular o sistema imune, e, sua atividade  
 309 antineoplásica trouxeram grandes perspectivas de cura (BELARDELLI et al.,  
 310 2002).

Figura 3 – Vias de sinalização do interferon



Fonte: (TAKAOKA; YANAI, 2006)

## 1.6 TRATAMENTO E IMUNOTERAPIAS

311 As neoplasias intraepiteliais são condições pré-cancerosas que podem ser  
312 tratadas para prevenir o câncer cervical invasivo. Desde 1980, o tratamento  
313 padrão para lesões neoplásicas passou de conização a frio para procedimentos  
314 menos radicais (SADLER et al., 2004).

315 A detecção das NICs precocemente ajuda a evitar a progressão da lesão para  
316 o câncer cervical. Nos casos de doença de grau elevado NIC II e III, o tratamento  
317 padrão é a conização cervical ou biópsia em cone (KUDOH et al., 2015;  
318 MASSAD et al., 2013).

319 As técnicas desenvolvidas para o tratamento de NICs, tem como base a  
320 ablação ou excisão da lesão. Das técnicas ablativas disponíveis para tratamento,  
321 incluem, a crioterapia, técnica de congelamento para destruir o epitélio anormal,  
322 e a vaporização à laser com dióxido de carbono que utiliza sonda para o  
323 congelamento do epitélio anormal, proporcionando um congelamento completo  
324 do colo uterino (CONNOR; HARTENBACH, 2008).

325 Estudos realizados para avaliar a evolução clínica nas intervenções  
326 terapêuticas em lesões induzidas pelo HPV, tem utilizado vacinas terapêuticas  
327 que incluem peptídeos, proteínas, vetores ativos, ácidos nucleicos e células,  
328 como forma de intervenção. Porém, respostas clínicas efetivas são raras, exceto  
329 em pacientes com lesões pré-malignas, e escassas em pacientes com lesões  
330 ginecológicas avançadas (VAN DER SLUIS et al., 2015).

331 Nas últimas décadas a confirmação de que o sistema imune protege o  
332 hospedeiro do desenvolvimento tumoral através da imunovigilância tornou-se  
333 fato. Porém, evidências mostram que existem mecanismos de escape das  
334 células tumorais (STANLEY, 2006), assim como o sistema imune pode contribuir  
335 promovendo o crescimento através da imunogenicidade ou pela supressão de  
336 mecanismos efetores da imunidade, que se tornaram a base para a hipótese da  
337 imunoedição do câncer (DUNN; KOEBEL; SCHREIBER, 2006).

338 Estudos visando a compreensão de como a tolerância, a imunidade e a  
339 imunossupressão regulam respostas antitumorais, aliadas a terapias alvo,  
340 sugerem que a ativação imunológica seja o caminho para obter uma resposta  
341 longa e durável nos pacientes com câncer (MELLMAN; COUKOS; DRANOFF,  
342 2011).

343 O conceito imunoterapia contra o câncer foi introduzido no final do século  
344 XIX, quando William B. Coley observou a redução tumoral pela injeção de  
345 produtos bacterianos ao redor do tumor. Desde então observações tais como a  
346 maior incidência de câncer em pacientes imunodeprimidos, e uma maior  
347 identificação de antígenos e linfócitos específicos do tumor estimularam  
348 pesquisas visando induzir respostas imunes específicas (LESTERHUIS;  
349 HAANEN; PUNT, 2011).

350 Um dos objetivos da imunoterapia é estimular respostas imunes vigorosas na  
351 eliminação das células cancerígenas, uma vez que, em pacientes com câncer o  
352 sistema imune é suprimido (ZHOU, 2014).

353 Com a descoberta das imunoterapias ao longo dos anos várias abordagens  
354 biotecnológicas de tratamento foram desenvolvidas. Anticorpos monoclonais  
355 utilizados na terapia do câncer são obtidos por técnicas avançadas que geram  
356 anticorpos otimizados para combater ou inibir vias de sinalização das células  
357 tumorais alvo (SCOTT; ALLISON; WOLCHOK, 2012).

358 Pacientes com câncer usualmente apresentam um perfil imunossupressor  
359 com baixas contagens de células T, e conseqüentemente no microambiente  
360 tumoral o infiltrado celular de linfócitos T citolíticos é diminuído. Portanto,  
361 observa-se o desenvolvimento tumoral pela predominância de linfócitos T  
362 auxiliares tipo 2 (Th2) e macrófagos M2 tolerantes ao tumor (GAO et al., 2015).

363 A utilização de imunomoduladores como tratamento do câncer tem sido muito  
364 empregada atualmente pela capacidade de estimular resposta imunes efectoras  
365 do próprio hospedeiro a reconhecer os antígenos tumorais e combater as células  
366 infectadas (NELSON; BALLOU, 2003).

367 Uma das imunoterapias utilizadas no tratamento da neoplasia intraepitelial  
368 cervical II e III (NIC) em mulheres com idade fértil não fumantes é o Interferon- $\alpha$   
369 2b peguilado (IFN $\alpha$ -2b peg). MICHELIN et al. (2015), utilizando o IFN $\alpha$ -2b  
370 peguilado subcutâneo, observaram no sangue periférico de pacientes com NIC  
371 II e III, um aumento significativo na produção de IFN- $\alpha$  por linfócitos T helper em  
372 resposta ao tratamento, com regressão da lesão neoplásica.

*2 Justificativa*



**JUSTIFICATIVA**

373 Em busca de tratamentos a fim de minimizar procedimentos invasivos e  
374 diminuir os riscos relacionados a problemas obstétricos, novas abordagens  
375 terapêuticas têm recebido grande atenção no manejo das lesões do colo uterino  
376 (VAN SETERS et al., 2008).

377 O emprego da imunoterapia para auxiliar no tratamento diminui a  
378 possibilidade destes procedimentos, acarretando em benefícios para as  
379 pacientes com neoplasia intraepitelial, evitando a conização ou traquelectomia  
380 radical, com preservação do colo uterino e a capacidade de reprodução, em  
381 especial o tratamento com interferon.

382 Bons resultados são observados em pacientes tratadas com interferon,  
383 porém, a falha também ocorre. Dentre os vários trabalhos realizados com  
384 interferon no Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON), dos resultados obtidos  
385 procuramos investigar o papel das células Natural Killer e evidenciar no  
386 tratamento, o perfil de resposta envolvendo estas células.

*3 Objetivos*

## OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

387 1- Avaliar e comparar entre os grupos com boa e má resposta a  
388 imunoterapia, os receptores, o perfil de citocinas, moléculas de adesão e  
389 coestimulatórias, determinando o perfil de resposta predominante das células NK  
390 nas amostras do sangue periférico de pacientes com NIC II e III tratadas com  
391 interferon alpha 2b peguilado.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

392 1- Avaliar e identificar, através da citometria de fluxo, os receptores NKG2D,  
393 NKT, KIR, CD30 e a produção de citocinas intracelulares IFN- $\gamma$  e IL-10 presentes  
394 em células NK obtidas do sangue periférico de pacientes com NIC II e III tratadas  
395 com interferon alpha 2b peguilado.

396 2- Avaliar e identificar através da citometria de fluxo as moléculas de adesão  
397 CD50, CD54, CD102, moléculas coestimulatórias CD80, CD86 presentes em  
398 células NK obtidas do sangue periférico de pacientes com NIC II e III tratadas  
399 com interferon alpha 2b peguilado.

400 3- Comparar e determinar o perfil de resposta identificados nos receptores  
401 NKG2D, NKT, KIRNKT2, CD30, produção de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10, moléculas  
402 de adesão CD50, CD54, CD102 e coestimulatórias CD80 e CD86 entre os  
403 grupos com boa e má resposta de pacientes com NIC II e III tratadas com  
404 interferon alpha 2b peguilado.

*4 Pacientes & Métodos*

## PACIENTES & MÉTODOS

### 4.1 CASUÍSTICA

405 Para este estudo os resultados das amostras do sangue periférico obtidos  
406 das pacientes foram distribuídos de acordo com o diagnóstico da lesão em  
407 consulta no Ambulatório de Ginecologia do Hospital de Clínicas da UFTM. A  
408 confirmação diagnóstica foi realizada pelo exame citológico juntamente com o  
409 exame histológico da biópsia de cada uma delas, representados nas tabelas 3 e  
410 4. Para a formação dos grupos, utilizamos o critério de regressão das lesões  
411 através do diagnóstico histológico pré e pós-tratamento, classificando-as como  
412 a seguir:

- 413 1) Com regressão da lesão, grupo de pacientes tratadas com boa resposta  
414 ao Interferon- $\alpha$  2b peguilhado.
- 415 2) Que não obtiveram regressão, grupo tratadas com má resposta ao  
416 tratamento.

417 O estudo prospectivo foi realizado com pacientes selecionadas  
418 aleatoriamente, sendo atendidas no Ambulatório de Ginecologia do Hospital de  
419 Clínicas da UFTM, apresentando sintomas clínicos e diagnóstico citológico de  
420 Neoplasia Intraepitelial Cervical NIC II ou III, e encaminhadas ao Ambulatório  
421 Maria da Glória, foram reavaliadas no Setor de Colposcopia determinando a  
422 extensão e grau das lesões. Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética e  
423 Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) e  
424 aprovado sob número 2432.

425 Confirmado o diagnóstico, as pacientes com lesões neoplásicas receberam  
426 orientações do (a) médico (a) responsável em iniciar o tratamento por uma das  
427 três opções: tratamento com IFN $\alpha$ -2b peguilado (Alfapeginterferona), conização  
428 por bisturi a frio, procedimento de excisão eletrocirúrgica (LEEP), cirurgia de alta  
429 frequência (CAF) ou histerectomia.

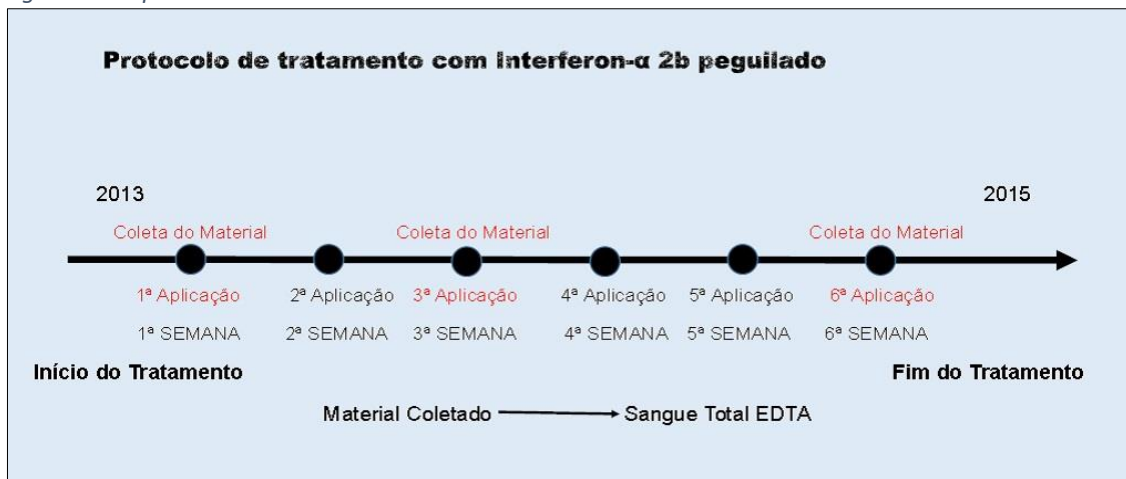
430 Ao optarem pela tentativa do tratamento com interferon, e atenderem os pré-  
431 requisitos, o termo de consentimento livre após esclarecimento (TCLE) (ANEXO  
432 1) era assinado logo no início do tratamento.

433 Como critério de exclusão para tratamento com interferon a paciente não  
434 deve ser tabagista, estar em período gestacional, imunossuprimida ou possuir

435 doença hepática ou renal. Os exames laboratoriais das transaminases, prova de  
 436 função renal, sorologia para HIV, Hepatites e Beta-HCG, foram solicitados.

437 As pacientes que se submeteram ao tratamento, e assinaram o termo de  
 438 consentimento livre e esclarecido, seguiram o protocolo de tratamento (FIGURA  
 439 4 e ANEXO 2), e as amostras coletadas do início ao fim das aplicações foram  
 440 processadas no Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON).

Figura 4 - Esquema de Tratamento das Pacientes



Fonte: Do Autor, 2016

441 O grupo de estudo foi composto por 18 pacientes (n=18) que se submeteram  
 442 ao tratamento com interferon-alpha 2b peguilado a uma dosagem de 120  
 443 mcg/0,5 mL por via subcutânea, sendo administradas 1 (uma) aplicação semanal  
 444 durante 6 semanas, realizadas sob orientação e acompanhamento médico. O  
 445 sangue periférico, coletado nos períodos pré-tratamento, 3ª e 6ª aplicações  
 446 foram processados para as marcações dos receptores, citocinas, moléculas de  
 447 adesão e coestimulatórias por citometria de fluxo.

448 Os grupos foram divididos conforme a evolução do tratamento  
 449 imunoterapêutico compreendido em 6 (seis) aplicações semanais subcutâneas  
 450 e os períodos de coleta do sangue periférico pré-tratamento, 3ª e 6ª aplicações.  
 451 Os grupos então avaliados foram Geral Pré-tratadas, tratadas 3ª e 6ª Aplicação,  
 452 e, Pré-tratadas, 3ª e 6ª Aplicação Boa Resposta (n=10) e Pré-tratadas, 3ª e 6ª  
 453 Aplicação Má Resposta (n=08) (TABELAS 4 e 5).

454 Em nosso estudo observamos o envolvimento das células NK frente ao  
 455 tratamento com interferon alpha 2b peguilado, avaliando os receptores

456 específicos destas células, o perfil de citocinas, moléculas de adesão, e  
457 coestimulatórias envolvidas na resposta ao tratamento.

## 4.2 DADOS CLÍNICOS

458 Os dados clínicos de cada uma das pacientes foram coletados por acesso ao  
459 prontuário médico, sendo anotados o diagnóstico e avaliação médica antes do  
460 tratamento com interferon, pelo resultado da citologia, colposcopia e confirmação  
461 com o resultado da biópsia. A representação dos dados coletados está na tabela  
462 abaixo:

*Tabela 1 - Características clínicas das pacientes selecionadas para o estudo*

Paciente	Idade	Diagnóstico	Resposta	Paridade	Conduta
1	36	NIC III	Boa	Nulípara	Seguimento
2	82	NIC III	Má	Multípara	Conização
3	54	NIC III	Boa	Primípara	Seguimento
4	28	NIC II	Boa	Tercípara	Seguimento
5	32	NIC III	Má	Tercípara	Conização
6	35	NIC III	Má	Primípara	Conização
7	18	NIC II	Má	Nulípara	Cauterização
8	34	NIC II	Má	Secundípara	Conização
9	38	NIC III	Boa	Quartípara	Seguimento
10	37	NIC II	Má	Tercípara	Cauterização
11	34	NIC III	Boa	Nulípara	Cauterização
12	47	NIC III	Boa	Secundípara	Seguimento
13	28	NIC III	Boa	Nulípara	Seguimento
14	24	NIC III	Má	Tercípara	Cauterização
15	28	NIC II	Boa	Nulípara	Seguimento
16	60	NIC III	Boa	Multípara	Acompanhamento
17	33	NIC III	Má	Nulípara	CAF
18	42	NIC III	Boa	Primípara	CAF

Fonte: Do Autor, 2016 (pesquisa de campo)

### 4.3 COLETA DO SANGUE PERIFÉRICO

463 A coleta do sangue periférico das pacientes selecionadas para este trabalho  
464 foi através de punção venosa superficial de melhor acesso diminuindo o  
465 desconforto e dor local, sendo mais utilizada a punção da veia cubital mediana  
466 devendo a agulha introduzida formar um ângulo de 20° a 30° com a pele. A coleta  
467 foi realizada pelo sistema fechado à vácuo e agulhas estéreis. Nos casos de  
468 difícil acesso a este local medidas alternativas foram tomadas para a coleta do  
469 material necessário, como por exemplo o uso de butterfly (escalpe) facilitando o  
470 acesso a outros locais de punção. Posteriormente as amostras coletadas foram  
471 acondicionadas em estantes e armazenadas sob refrigeração. As mesmas foram  
472 identificadas pelo nome e RG do protocolo de entrada no ambulatório, e criado  
473 um banco de dados para maior confiabilidade dos resultados.

474 O sangue periférico obtido por punção venosa, foi acondicionado em tubos  
475 de 4 mL com EDTA no momento inicial do tratamento e nos momentos  
476 posteriores, identificados com o protocolo de registro de cada uma, restringindo  
477 a perda da confidencialidade nos resultados e armazenados sob refrigeração  
478 para o transporte até o laboratório, onde foram realizados o processamento para  
479 realização da citometria de fluxo.

### 4.4 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

480 Para a obtenção de leucócitos, o sangue total foi transferido para tubos  
481 cônicos de 50 mL, adicionando-se na proporção de 1:10 a solução de lise (BD  
482 *Biosciences - FACSTM Lysing Solution*). Após 20 minutos de incubação à  
483 temperatura ambiente, centrifugou-se o material durante 10 minutos, em uma  
484 rotação de 2000G, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado,  
485 mantendo o precipitado de células ao fundo do tubo cônico. Repetiu-se a  
486 centrifugação nas mesmas condições, por duas vezes, retirando o excesso da  
487 solução de lise, adicionando 30 ml de PBS (solução salina tamponada com  
488 fosfato) ao precipitado de células a cada centrifugação (FIGURA 5A).

489 Ao final da segunda centrifugação, retirou-se o PBS, deixando  
490 aproximadamente 1mL ao precipitado de células, para acrescentar 3 µL da  
491 proteína transportadora inibitória (BD Golgistop™). Incubou-se por 20 minutos,



492 a 4°C, ao abrigo da luz. As células foram lavadas por centrifugação, nas mesmas  
 493 condições anteriores, com 25 mL de PBS, para retirar o excesso de proteína  
 494 (FIGURA 5A).

495 Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante, conservando-se apenas o  
 496 precipitado de células, que foram ressuspensas em 1 mL de PBS. Em seguida,  
 497 transferiu-se 20µL das células ressuspensas para tubos Eppendorf contendo  
 498 180µL de solução de Turk, para determinar a quantidade de células obtidas. As  
 499 células foram contadas ao microscópio óptico, em câmara de Neubauer  
 500 (FIGURA 5A).

501 A suspensão de células foi transferida para tubos de ensaio sendo,  
 502 primeiramente, realizada a marcação extracelular, sendo distribuídos da  
 503 seguinte forma: dois tubos para as marcações dos receptores, um para  
 504 moléculas de adesão, dois para linfócitos T CD3<sup>+</sup> e moléculas co-estimulatórias  
 505 (TABELA 2) (FIGURA 5B).

506 O anticorpo utilizado para a marcação de membrana (extracelular) (TABELA  
 507 2) dos receptores foram o NKG2D APC BD (APC – *Allophycocyanin*), NKT FITC  
 508 BD (FITC - *Fluorescein Conjugate*) e KIRNKT<sub>2</sub> PE (PE – *Phycoerythrin*). Para a  
 509 marcação das moléculas de adesão foram CD50 FITC BD (FITC – *Fluorescein*  
 510 *Conjugate*), CD54 PeCy5 BD (PeCy5 – *Phycoerythrin/Cyanine dye*), CD102 PE  
 511 BD (PE - *Phycoerythrin*), utilizou-se o anticorpo CD3 ALEXA BD; para os  
 512 linfócitos T CD3<sup>+</sup>, e, CD 80 FITC BD (FITC – *Fluorescein Conjugate*), CD86  
 513 PE.BD (PE – *Phycoerythrin*), CD30 PE BD (PE - *Phycoerythrin*) para as  
 514 moléculas co-estimulatórias. Após a primeira marcação, incubavam-se as  
 515 células a 4°C por 30 minutos, ao abrigo da luz.

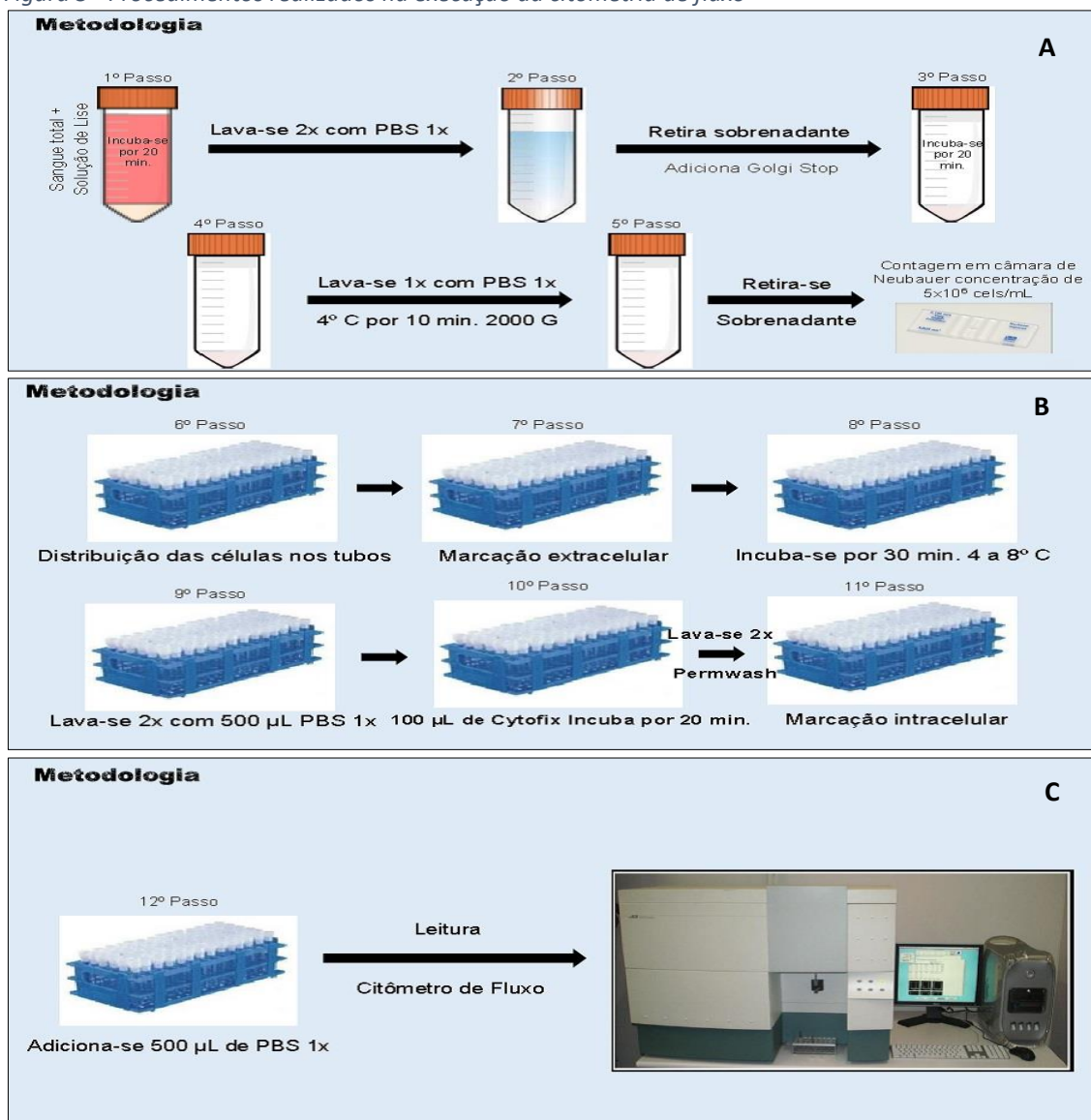
Tabela 2 - Marcações Extra e Intracelulares para as células NK

Tubos	Extracelular	Intracelular
1	NKG2D APC + NKT FITC + KIRNKT <sub>2</sub> PE	
2	NKG2D APC	IFN-γ FITC + IL-10 PE
3	CD50 FITC + CD54 PeCy5 + CD102 PE	
4	CD3 ALEXA + CD80 PeCy5 + CD86 PE	
5	CD3 ALEXA + CD30 PE + NKT FITC	

Fonte: Do Autor, 2016

516 Em seguida, eram realizadas duas lavagens das células com PBS,  
 517 intercalando centrifugações a 2000G, por 10 minutos a 4°C, para a remoção do  
 518 excesso de anticorpos. Posteriormente, as células eram preparadas para a  
 519 marcação intracelular, adicionando-se solução de permeabilização e fixação (BD  
 520 Cytofix/Cytoperm™) e incubando-se a 4°C por 20 minutos, ao abrigo da luz.  
 521 Lavou-se as células com solução tampão (BD Perm/Wash™ Buffer) por duas  
 522 vezes, intercalando centrifugações nas mesmas condições anteriormente  
 523 citadas.

Figura 5 - Procedimentos realizados na execução da citometria de fluxo



Fonte: Do Autor; 2016

524 A marcação intracelular (TABELA 2) foi realizada com os seguintes  
 525 anticorpos, cuja sequência repetia-se somente para a marcação extracelular do

526 tubo dois: IFN- $\gamma$  FITC BD e IL-10 PE BD. O isotipo controle foi: Mouse IgG2a PE  
527 BD. Após incubação de 30 minutos, a 4°C, ao abrigo da luz, as células eram  
528 lavadas com solução tampão (BD Perm/Wash™ Buffer) duas vezes, intercalando  
529 centrifugações nas mesmas condições. Por fim, as células eram ressuspensas  
530 em 500  $\mu$ L de PBS para a leitura no citômetro BD FACSCalibur™ (FIGURA 5B  
531 e C). Os passos executados na realização da citometria de fluxo estão  
532 representados esquematicamente nas figuras 5A, 5B e 5C.

533 Na avaliação dos resultados utilizamos parâmetros como a percentagem de  
534 gate e intensidade de fluorescência. Com a percentagem de gate é possível  
535 determinar a característica celular analisada pelo citômetro de fluxo, como por  
536 exemplo, linfócitos, neutrófilos, monócitos entre outras células, permitindo  
537 selecionar o tipo de população celular estudada, e através da intensidade de  
538 fluorescência é possível verificar pela excitação dos fluorocromos utilizados na  
539 marcação, a quantidade de moléculas presente na célula, que interagiram com  
540 seus receptores ou ligantes e absorveram o fluoróforo específico para cada  
541 proteína. Quanto maior a intensidade de fluorescência maior a concentração de  
542 proteína presente na célula analisada.

#### 4.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

543 Os resultados obtidos e armazenados no banco de dados, foram analisados  
544 entre os grupos formados das pacientes pré-tratadas, tratadas 3ª e 6ª aplicação  
545 Geral para as marcações realizadas (TABELA 2), utilizando 1 way ANOVA  
546 Friedman test e o teste de Dunn's Múltiplas comparações entre os grupos  
547 considerando significativos os valores de p menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ). E a  
548 comparação entre os grupos pré-tratadas, 3ª e 6ª aplicação boa e má resposta  
549 utilizou-se o Mann-Whitney test não paramétrico para amostras de frequência  
550 não pareadas pela mediana dos resultados. Todos os dados foram submetidos  
551 ao software GraphPad Prism 5® considerando significativos os resultados de p  
552 menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## *5 Resultados*

## RESULTADOS

### 5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

553 De acordo com o diagnóstico da lesão, 6 pacientes apresentaram NIC II e 12  
 554 pacientes NIC III (TABELA 3). Destas 18 pacientes, 10 (55,5%) foram inseridas  
 555 no Grupo Boa Resposta ao tratamento com interferon- $\alpha$  2b peguilhado, e 8  
 556 (44,4%) no Grupo Má Resposta ao tratamento (TABELAS 4 e 5).

*Tabela 3 - Diagnóstico e número de pacientes selecionadas para o estudo*

Diagnóstico	Número (n)
NIC II	n = 06
NIC III	n = 12
<b>Total</b>	<b>n = 18</b>

Fonte: Do Autor, 2016

*Tabela 4 - Relação das pacientes selecionadas do Grupo Boa Resposta*

Paciente	Diagnóstico Pré-tratamento	Diagnóstico Pós-tratamento
1	NIC III	NIC II
2	NIC II	EENC/HE*
3	NIC II	NIC I
4	NIC III	CC/MI**
5	NIC III	NIC II
6	NIC III	HPV
7	NIC III	CCL/MEM***
8	NIC III	MEASI****
9	NIC II	CCL/MEM***
10	NIC III	NIC II

Fonte: Do Autor, 2016

\*Epitélio Estratificado não ceratinizado com Hiperplasia e Espongiose

\*\*Cervicite crônica/metaplasia imatura

\*\*\*Cervicite crônica leve/Metaplasia escamosa madura

\*\*\*\*Metaplasia escamosa atípica de significado indeterminado

*Tabela 5 - Relação das pacientes selecionadas do Grupo Má Resposta*

Paciente	Diagnóstico Pré-tratamento	Diagnóstico Pós-tratamento
1	NIC II	NIC II
2	NIC III	NIC III
3	NIC III	NIC III
4	NIC III	NIC III
5	NIC II	NIC II
6	NIC III	NIC III
7	NIC III	NIC III
8	NIC II	NIC II

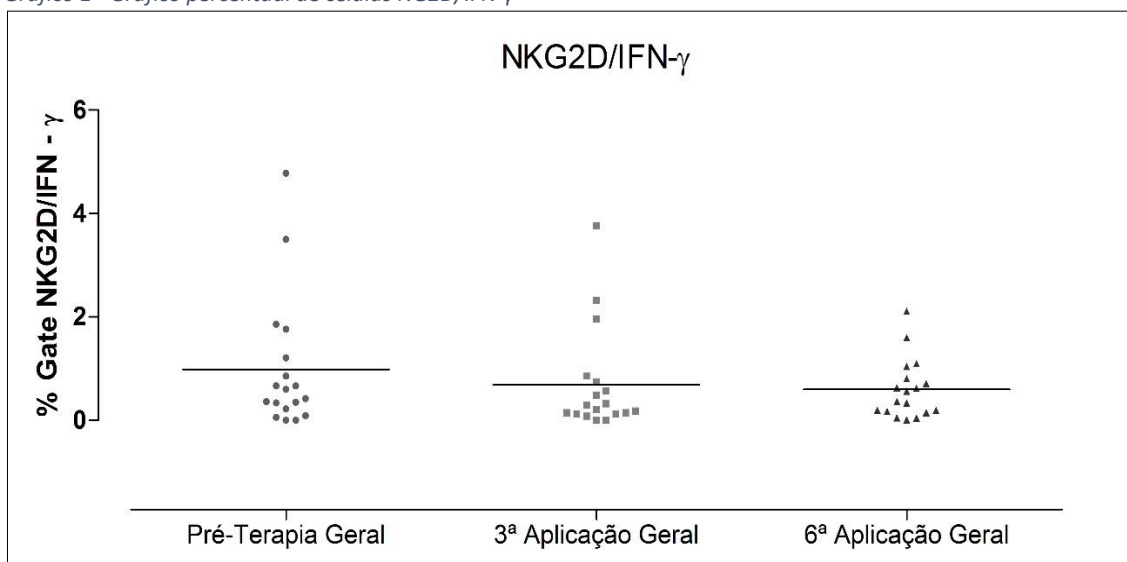
Fonte: Do Autor, 2016

## 5.2 AVALIAÇÃO DOS RECEPTORES, CITOCINAS, MOLECULAS DE ADESÃO E COESTIMULATÓRIAS

557 Na avaliação dos receptores de ativação, bem como os receptores inibitórios  
558 das células NK e NKT para determinar o perfil da resposta imune em mulheres  
559 infectadas pelo HPV não se observa resultados significativos nos grupos  
560 analisados.

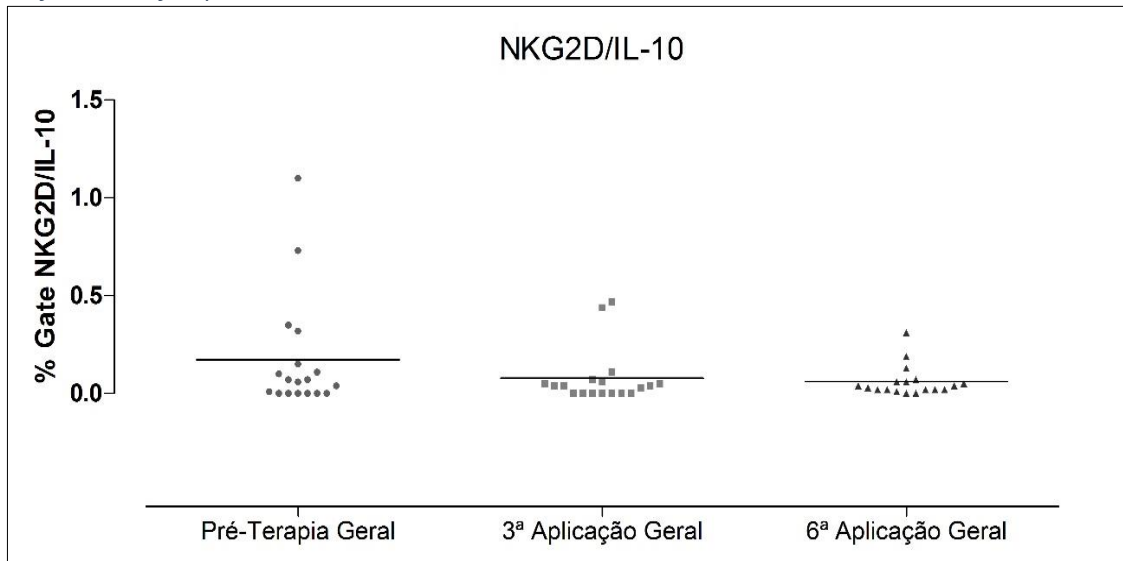
561 As dosagens realizadas com a marcação para o receptor NKT, NKG2D,  
562 CD30 junto as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10, as moléculas de adesão CD102, CD54,  
563 CD50 e moléculas coestimulatórias CD86, CD80 avaliadas em dupla marcação,  
564 não apresentaram significância estatística na avaliação geral dos resultados.  
565 Contudo, podemos observar que o comportamento sistêmico das células NK  
566 frente ao tratamento com interferon- $\alpha$  2b peguilado nestes grupos  
567 permaneceram inativadas. Nesta avaliação, utilizamos as marcações  
568 específicas (NKG2D/IFN- $\gamma$ ), (NKG2D/IL-10), (NKG2D/CD30), (NKT/CD30),  
569 (CD102/CD50), (CD54/CD50), (CD86/CD80), para cada paciente, representados  
570 nos Gráficos 1 a 7.

Gráfico 1 - Gráfico percentual de células NKG2D/IFN- $\gamma$



**Gráfico 1:** Análise da percentagem de gate das células marcadas NKG2D/IFN- $\gamma$  entre os grupos pesquisados. No grupo pré-terapia, 3ª e 6ª aplicação observa-se esta população celular sem significância estatística ( $p=0,4857$ ).

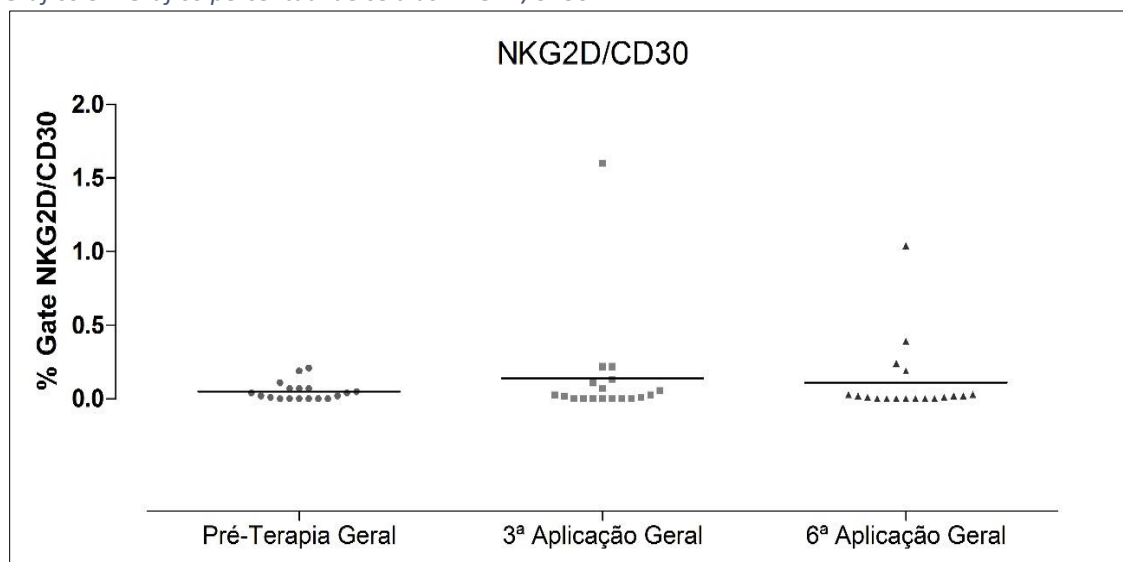
Gráfico 2 - Gráfico percentual de células NKG2D/IL-10



**Gráfico 2:** Análise da percentagem de gate das células marcadas NKG2D/IL-10 nos grupos pesquisados. Observa-se para esta população celular resultados não significativos estatisticamente ( $p=0,4216$ ).

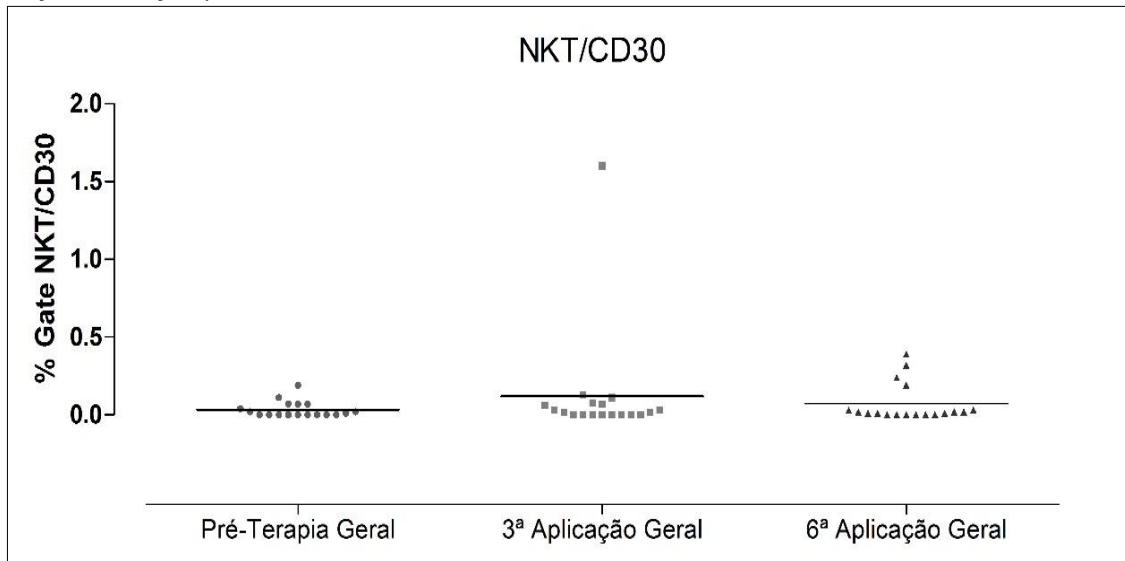
571 Analisando os gráficos podemos verificar que apesar dos resultados não  
 572 apresentarem significância estatística, observamos que as células NK  
 573 circulantes das pacientes para as marcações NKG2D/IFN- $\gamma$ , NKG2D/IL-10  
 574 (GRÁFICOS 1 e 2), permaneceram estáveis em todo o tratamento.

Gráfico 3 – Gráfico percentual de células NKG2D/CD30



**Gráfico 3:** Análise da percentagem de gate das células marcadas NKG2D/CD30 nos grupos pesquisados, observam-se níveis para a população celular NKG2D/CD30 permanentes no grupo pré-terapia e durante as aplicações do tratamento com interferon ( $p=0,5331$ ).

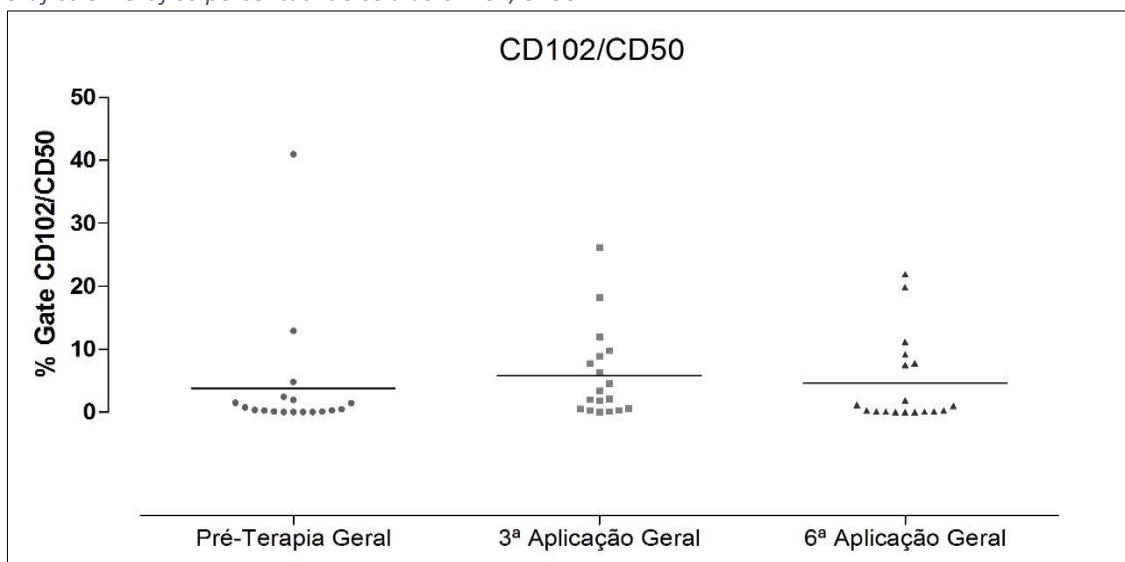
Gráfico 4 - Gráfico percentual de células NKT/CD30



**Gráfico 4:** Análise da percentagem de gate das células marcadas NKT/CD30, observa-se um padrão estável durante todo o tratamento para esta população celular em todos os grupos analisados ( $p=0,8052$ ).

575 Na análise dos gráficos 3 e 4 podemos observar que o perfil de resposta para  
 576 os marcadores NKG2D/CD30, NKT/CD30 não apresentou significância  
 577 estatística, demonstrando que as células NK circulantes das pacientes  
 578 permanecem em todo o período do tratamento estáveis.

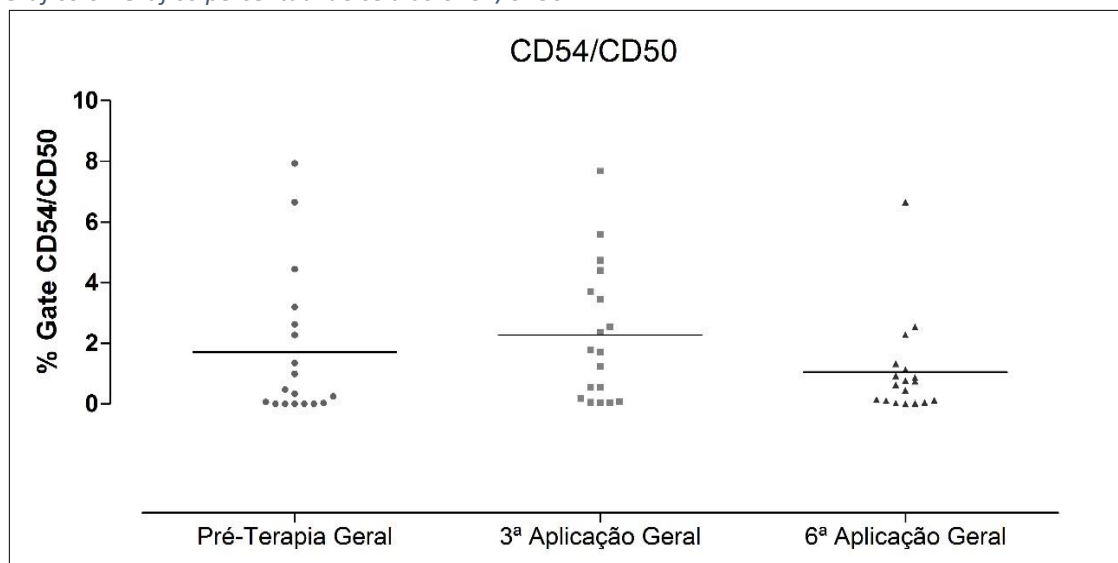
Gráfico 5 - Gráfico percentual de células CD102/CD50



**Gráfico 5:** Análise da percentagem de gate das células marcadas CD102/CD50 não apresentam significância estatística na população destas células, porém observa-se uma tendência a aumentar na 6ª aplicação ( $p=0,0660$ ).



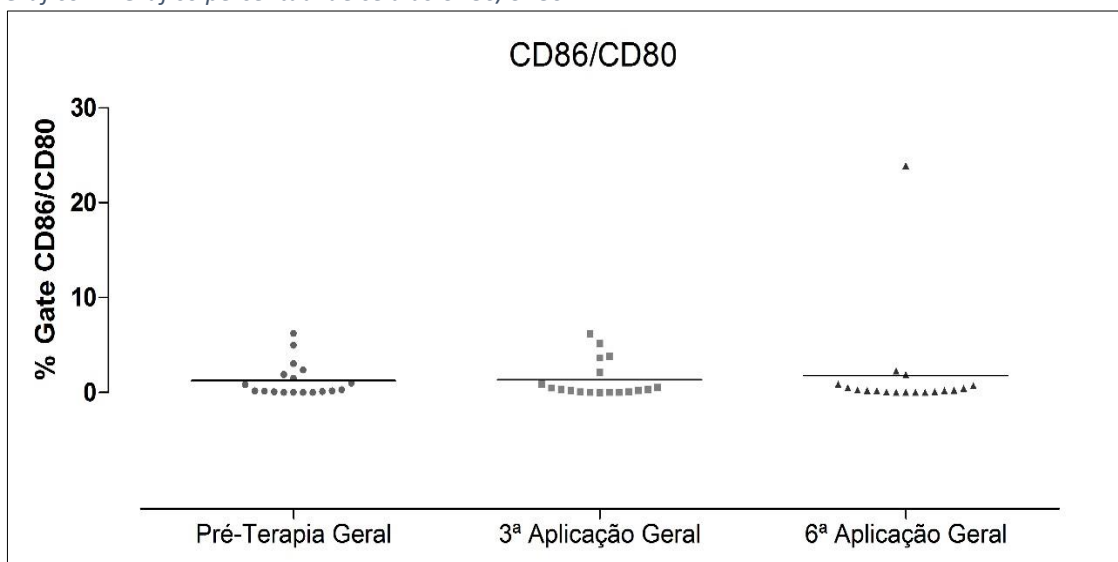
Gráfico 6 - Gráfico percentual de células CD54/CD50



**Gráfico 6:** Análise da percentagem de gate das células marcadas CD54/CD50 nos grupos pesquisados. As populações celulares com estas moléculas de adesão não apresentam significância estatística ( $p=0,1496$ ).

579      Ao analisarmos os gráficos 5, 6 acima, que representam marcações para as  
 580 moléculas de adesão e coestimulatórias das células NK totais dos grupos,  
 581 observamos para a população celular do CD102/CD50 e CD54/CD50, que não  
 582 houve significância estatística ( $p=0,0660$  e  $p=0,1496$  respectivamente).

Gráfico 7 - Gráfico percentual de células CD86/CD80



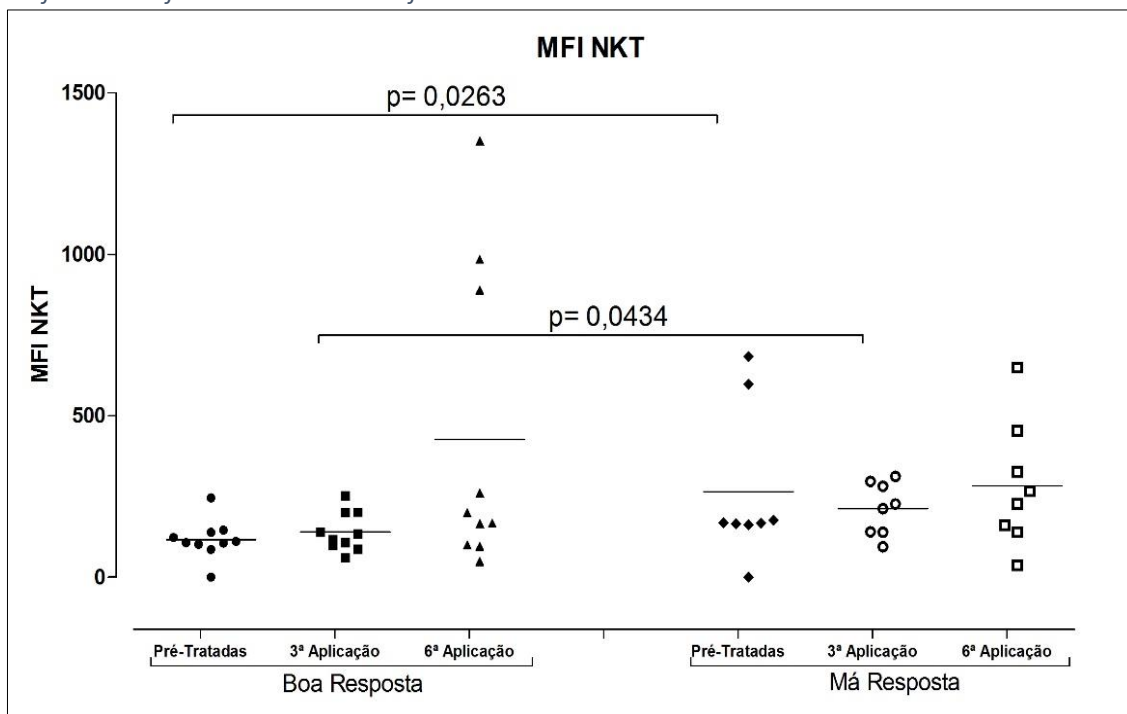
**Gráfico 7:** Análise da percentagem de gate das células marcadas CD86/CD80. Os níveis sistêmicos de CD86/CD80 permanecem estáveis ( $p=0,4857$ ).

583 No gráfico 7 as células marcadas CD86/CD80 entre os grupos analisados  
 584 apresentam níveis circulantes destas células estáveis durante todo o tratamento  
 585 e os resultados não apresentaram diferença estatística significativa.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DOS RECEPTORES, CITOCINAS, MOLECULAS DE ADESÃO E COESTIMULATÓRIAS EM PACIENTES DE ACORDO COM A RESPOSTA A IMUNOTERAPIA

586 A avaliação individual do comportamento das células NK através dos  
 587 receptores, citocinas, moléculas de adesão e coestimulatórias se deu após a  
 588 separação dos pós terapia com interferon alfa 2b peguilado, dividindo os grupos  
 589 entre boa e má resposta, observamos o comportamento das células NK em  
 590 resposta ao tratamento. Nos Gráficos 8 a 17 a representação da avaliação e  
 591 identificação das células NKT, receptores NKG2D e KIRNKT, citocinas IFN- $\gamma$ , IL-  
 592 10, moléculas de adesão e coestimulatórias CD50, CD54, CD102, CD80 e CD86.

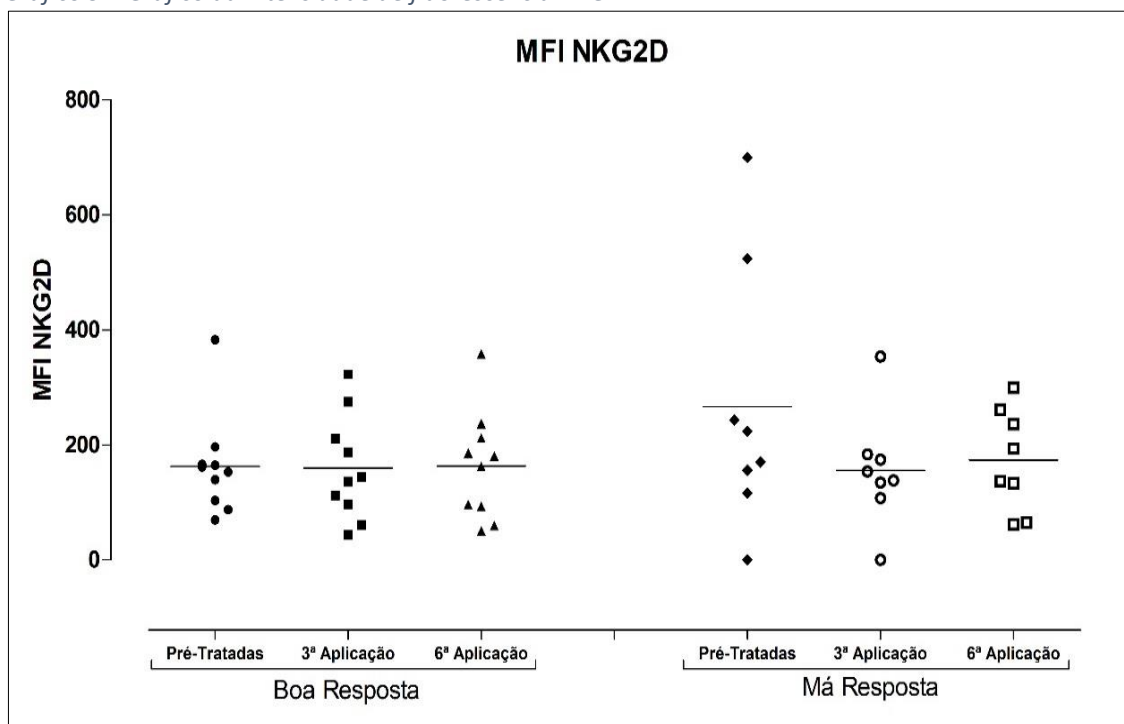
Gráfico 8 – Gráfico da intensidade de fluorescência NKT



**Gráfico 8:** Análise da intensidade de fluorescência das células NKT. Na comparação entre os grupos pré boa resposta vs pré má resposta, houve um aumento significativo desta população celular de NKT ( $p=0,0263$ ). Entre os grupos 3ª aplicação boa e má resposta também é possível observar este aumento ( $p=0,0434$ ).

593 Na análise específica das células NK apresentando marcação positiva para  
 594 receptores de células T marcadas com NKT FITC observa-se significância  
 595 estatística no momento inicial do tratamento entre os grupos pré-tratadas boa  
 596 resposta vs pré-terapia má resposta. Apesar da análise observada no gráfico 4  
 597 entre as células NKT/CD30 não apresentarem diferença significativa, o gráfico 8  
 598 demonstra uma intensidade de fluorescência significativa para células NKT  
 599 positivas presente na comparação dos grupos pré tratadas e 3ª aplicação boa e  
 600 má resposta ( $p=0,0263$  e  $p=0,0434$  respectivamente).

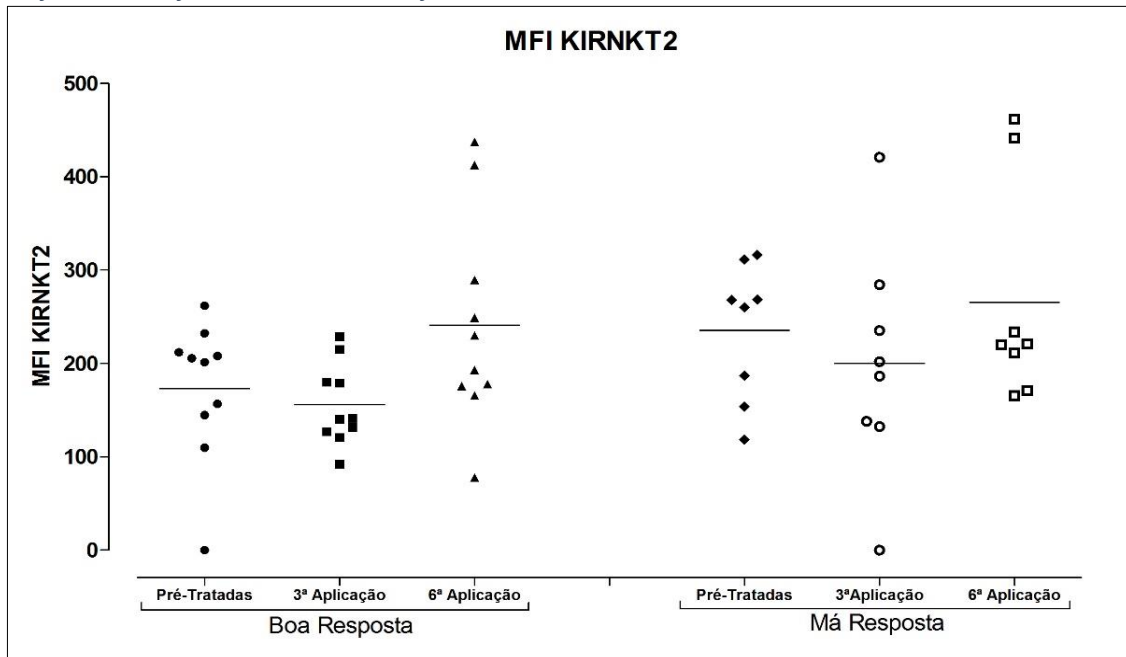
Gráfico 9 – Gráfico da Intensidade de fluorescência NKG2D



**Gráfico 9:** Análise da intensidade de fluorescência das células NKG2D entre os grupos. Observamos que as células marcadas NKG2D não apresentaram significância estatística ( $p=0,6965$ ).

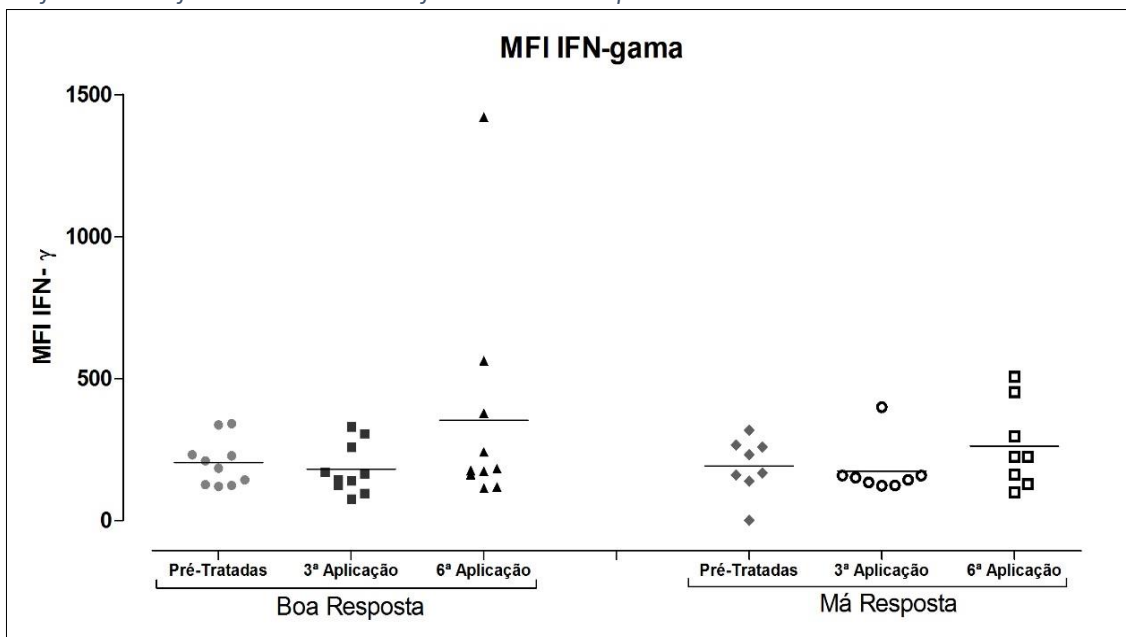
601 Verificando o gráfico 9 observamos que entre os grupos não apresentaram  
 602 diferença estatística significativa para as marcações dos receptores NKG2D  
 603 quando comparados. Porém, observa-se menor intensidade de fluorescência  
 604 entre as pacientes do grupo má resposta ao final do tratamento na 6ª aplicação  
 605 ( $p=0,6965$ ) se comparados aos níveis da intensidade de fluorescência do grupo  
 606 6ª aplicação boa resposta.

Gráfico 10 – Gráfico da intensidade de fluorescência KIRNKT



**Gráfico 10:** Análise da intensidade de fluorescência das células positivas para KIRNKT2, não se observa diferença estatística significativa ( $p=0,1220$ ).

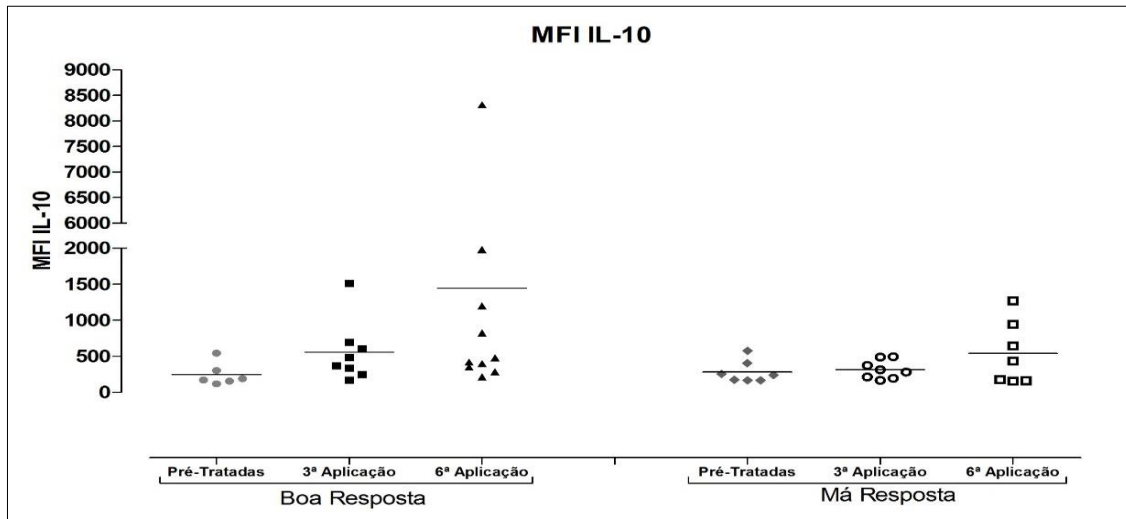
607 Ao observamos o gráfico 10 a intensidade de fluorescência para os grupos  
 608 pesquisados dos receptores não há significância estatística na comparação  
 609 entre eles ( $p=0,1220$ ).

Gráfico 11 – Gráfico da intensidade de fluorescência IFN- $\gamma$ 

**Gráfico 11:** Análise da intensidade de fluorescência das células expressando IFN- $\gamma$  nos grupos não observamos significância estatística entre as comparações ( $p=0,7618$ ).

610 O gráfico 11 demonstra a análise dos níveis de IFN- $\gamma$  nos grupos estudados,  
 611 apresentando intensidade de fluorescência sem diferença estatística significativa  
 612 em suas comparações.

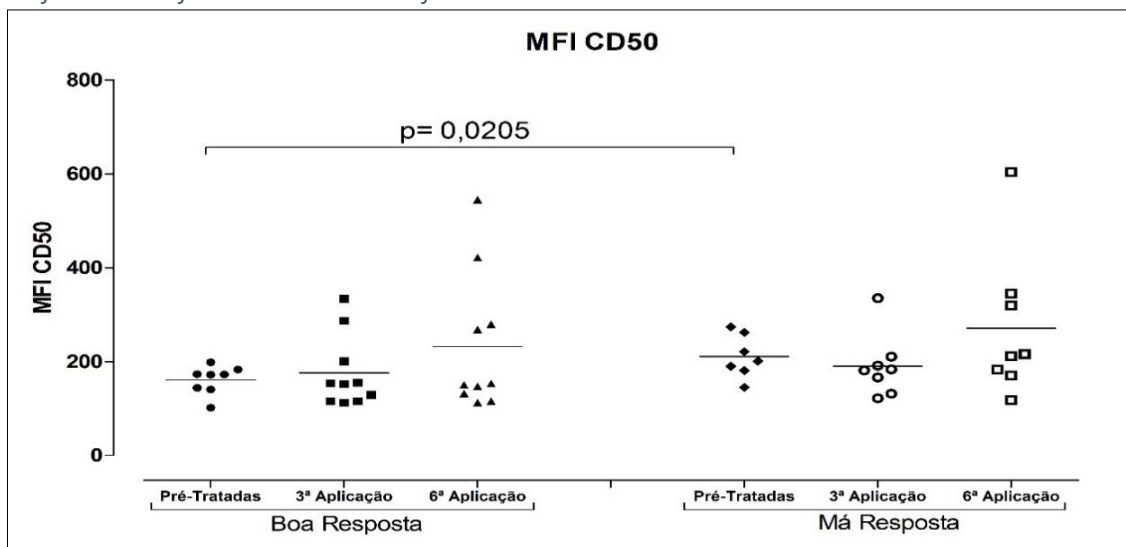
Gráfico 12 – Gráfico da intensidade de fluorescência IL-10



**Gráfico 12:** Na análise da intensidade de fluorescência da interleucina 10 não se observa resultados estatísticos significativos na comparação entre os grupos ( $p=0,2345$ ).

613 Podemos verificar pelo gráfico 12 que a intensidade de fluorescência das  
 614 células nos grupos a intensidade de fluorescência para a IL-10 não apresentou  
 615 diferença estatística significativa ( $p=0,2345$ ).

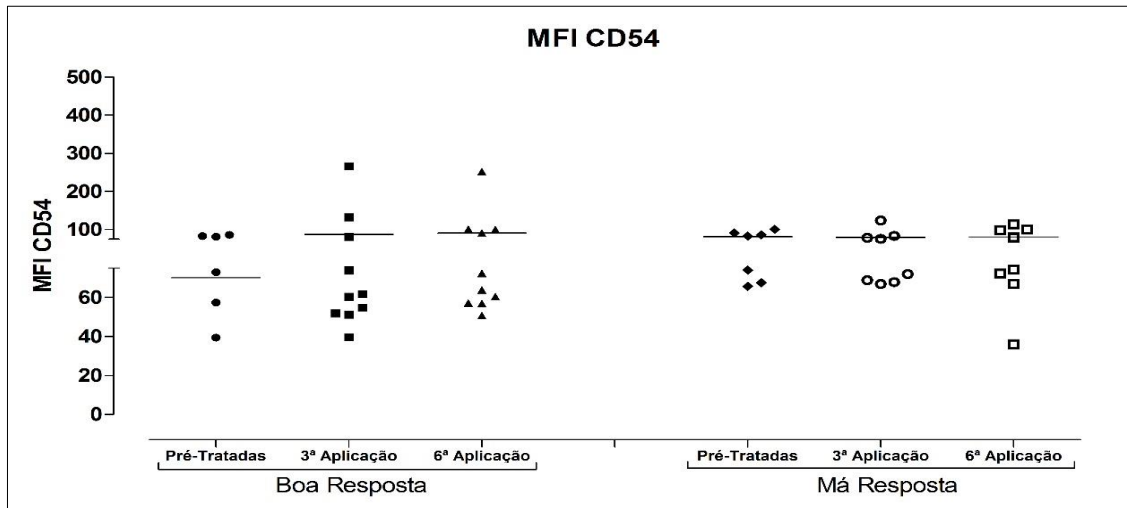
Gráfico 13 – Gráfico da intensidade de fluorescência CD50



**Gráfico 13:** Análise da intensidade de fluorescência do CD50 expresso nas células NK. O resultado significativo entre os grupos pré boa resposta vs pré má resposta  $p<0,05$  demonstra maior intensidade de fluorescência da molécula de adesão no momento inicial do tratamento para o grupo pré-terapia má resposta ( $p=0,0205$ ).

616 O gráfico 13 mostra o valor de p significativo para o CD50 apresentando um  
 617 maior número de células identificadas com estas moléculas no grupo pré-  
 618 tratadas má resposta, se comparado ao grupo pré-tratadas boa resposta.

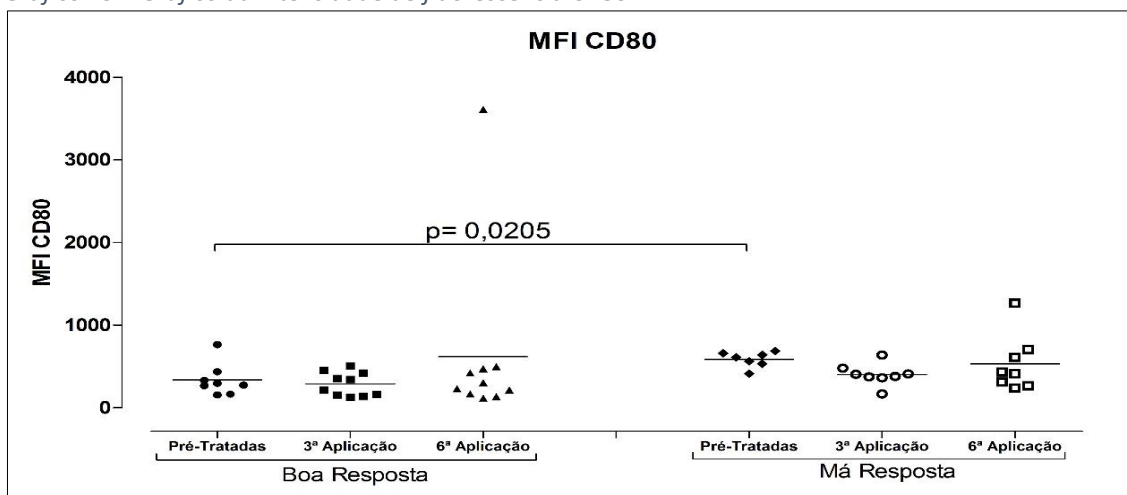
Gráfico 14 – Gráfico da intensidade de fluorescência CD54



**Gráfico 14:** Na análise da intensidade de fluorescência do CD54 expresso entre os grupos, não houve significância estatística entre eles ( $p=0,2370$ ).

619 Em análise, o gráfico acima mostra os valores para o CD54, onde a  
 620 representação das pacientes em tratamento a intensidade de fluorescência não  
 621 apresenta resultados estatísticos significativos.

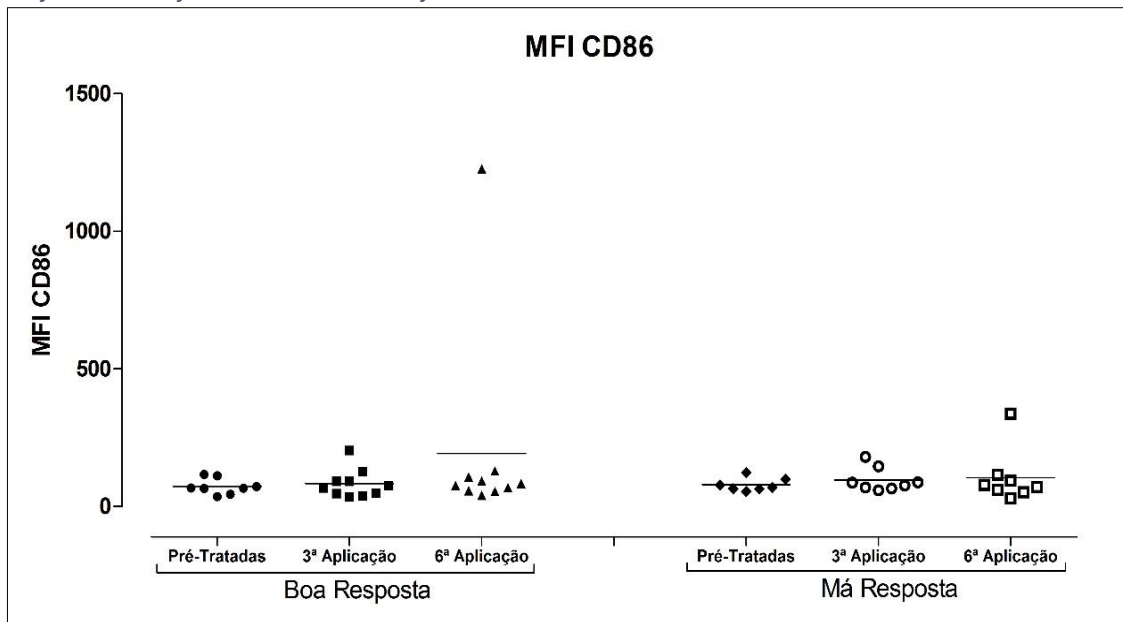
Gráfico 15 – Gráfico da intensidade de fluorescência CD80



**Gráfico 15:** Análise da intensidade de fluorescência do CD80 expresso nas células NK entre os grupos. Valores significativos com  $p<0,05$  observados nos grupos pré boa resposta vs pré má resposta indicam um aumento na expressão destas moléculas em pacientes com má resposta antes de iniciarem o tratamento com interferon- $\alpha$  2b peguilado ( $p=0,0205$ ).

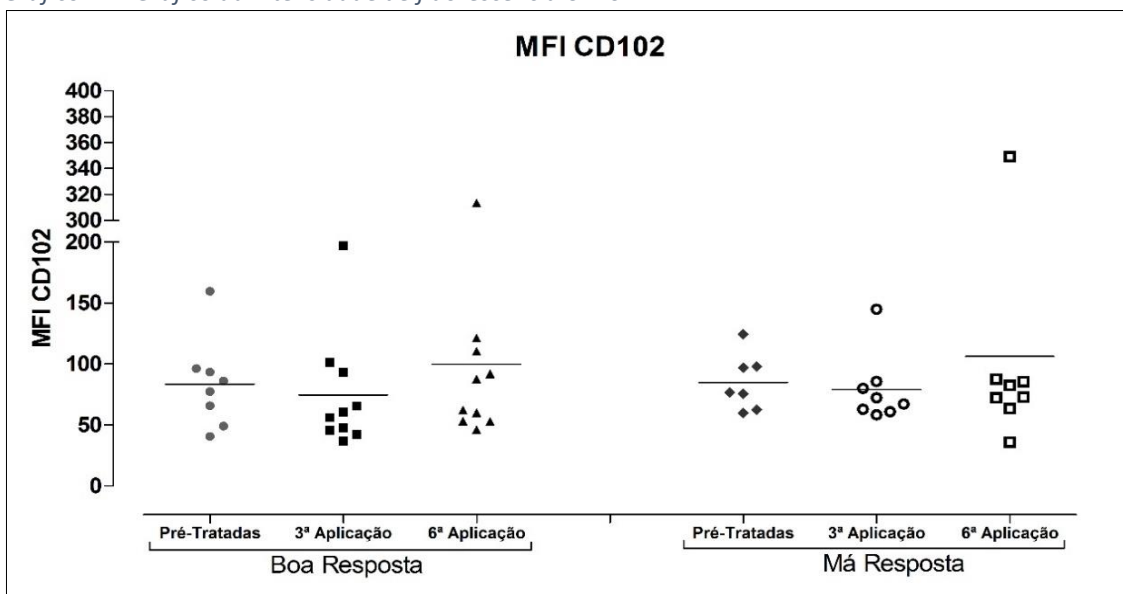
622 Na análise específica da molécula coestimulatória CD80 o resultado  
 623 significativo ( $p=0,0205$ ) é observado no grupo pré-tratadas boa resposta vs má  
 624 resposta. O gráfico indica que as pacientes com má resposta, possuem maior  
 625 intensidade de fluorescência em específico para este marcador CD80 em  
 626 relação as pacientes que obtiveram êxito ao se tratarem com interferon.

Gráfico 16 – Gráfico da intensidade de fluorescência CD86



**Gráfico 16:** Análise da intensidade de fluorescência do CD86 expresso nas células NK, pode-se observar nos grupos resultados não significativos para as células marcadas CD86 positivas.

Gráfico 17 - Gráfico da intensidade de fluorescência CD102



**Gráfico 17:** Análise da intensidade de fluorescência do CD102 expresso nos grupos boa e má resposta. Observa-se a expressão do CD102 estáveis entre os grupos ( $p=0,2370$ ).

627 A análise da molécula coestimulatória CD86, pode-se observar no gráfico 16  
628 níveis estáveis no período de tratamento não havendo significância estatística  
629 da intensidade de fluorescência para este marcador. No gráfico 17 as  
630 intensidades de fluorescência para o CD102 nos grupos pesquisados também  
631 não apresentam significância estatística.

632 No anexo 3 encontram-se todas as pacientes e os respectivos valores da  
633 percentagem de gate e intensidade de fluorescência, junto ao diagnóstico  
634 pré/pós a imunoterapia com interferon.



## *6 Discussão*

## DISCUSSÃO

635       Imunoterapias tem se tornado procedimentos cada vez mais comuns no  
636 tratamento de vários tipos de câncer. Os motivos e benefícios são evidentes,  
637 pela decisão em tratar pacientes por métodos não invasivos, onde a cura,  
638 embora dependa da resposta imunológica, não deixa sequelas.

639       Em pesquisas focadas no tratamento do câncer estimulando o sistema imune  
640 a combater as células modificadas ou infectadas, a imunoterapia com interferon-  
641  $\alpha$  2b objeto de estudo desta pesquisa, tornou-se uma das formas de abordagem  
642 para eliminar a progressão de lesões neoplásicas estimulando o sistema imune  
643 e propiciando uma resposta efetora no combate a estas células.

644       Com a extinção da possibilidade de procedimentos invasivos, o tratamento  
645 imunoterápico com interferon de pacientes com neoplasias intraepiteliais,  
646 preserva o colo uterino evitando a conização ou traquelectomia radical, e a  
647 capacidade de reprodução é preservada em pacientes com idade fértil.

648       Vários estudos utilizando a imunoterapia com imunomoduladores, foram  
649 publicados, e, desde então tem sido usados no tratamento de várias neoplasias,  
650 onde as mais comuns são para o carcinoma hepatocelular e o melanoma  
651 (ZITVOGEL et al., 2015).

652       As células NKs por serem componentes chave da resposta imune inata e  
653 responsáveis por lisar células com baixa expressão de MHC de classe I, e  
654 células infectadas por vírus, são potentes produtoras de interferons do tipo I  
655 necessitando ser ativadas para iniciar a produção de citocinas e tornarem-se  
656 efectoras (HARLIN et al., 2007).

657       Estudos realizados para avaliar o papel destas células e a administração do  
658 IFN-TI, mostraram que os indivíduos tratados com esta citocina aumentaram o  
659 tempo de vida livre de doença, bem como as recidivas se comparado aos  
660 indivíduos que não foram tratados (DUNN; KOEBEL; SCHREIBER, 2006).

661       Nos últimos anos vários trabalhos têm sido realizados no Instituto de  
662 Pesquisa em Oncologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (IPON-  
663 UFTM), demonstrando a eficácia da imunoterapia com interferon em pacientes  
664 com NIC II e NIC III. TIRONE (2008), avaliou por RT-PCR a expressão do mRNA  
665 do IFN- $\alpha$ , dos receptores de IFN- $\alpha$  (IFNAR1 e IFNAR2) e a expressão de um dos  
666 elementos responsivos pelo estímulo do interferon (ISRE) presente nas regiões

667 dos genes induzidos pelo IFN- $\alpha$ , através da expressão do mRNA da enzima  
668 2'5'Oligoadenilato sintetase (2'5'OAS) em biópsias de pacientes com NIC I, II e  
669 III, concluindo que as amostras de NICs apresentavam DNA do HPV em 50%  
670 (14/28) das pacientes e uma baixa expressão do mRNA do receptor de interferon  
671 subunidade 1 e 2. RIBEIRO (2010), utilizando a imunoterapia de IFN $\alpha$ -2b  
672 intralesional em pacientes com NICs de alto grau, obteve uma resposta  
673 satisfatória em quase 100% de pacientes não fumantes e falha no tratamento  
674 em quase 100% das fumantes. RAMOS (2009), observou ausência de  
675 expressão das citocinas do perfil Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12) antes do  
676 tratamento com IFN $\alpha$ -2b em pacientes que tiveram resposta e nas que tiveram  
677 falha. Após o tratamento, pacientes que apresentaram resposta satisfatória  
678 expressaram IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ , sugerindo que essas citocinas possam ter  
679 bloqueado a expressão de oncoproteínas virais do HPV, promovendo a  
680 regressão da lesão de alto grau concluindo que durante o tratamento com IFN $\alpha$ -  
681 2b a concentração de IL-6 e TNF- $\alpha$  na secreção vaginal é mais elevada em  
682 pacientes com falha no tratamento quando comparada com as que tiveram  
683 resposta, sendo estas citocinas avaliadas por citometria de fluxo. PEGHINI  
684 (2009), descreveu após o estudo do perfil imunológico de pacientes com NIC em  
685 diferentes graus (LSIL e HSIL) e carcinoma invasivo que a progressão da lesão  
686 é inversamente proporcional ao perfil Th1, a resposta imune celular é suprimida  
687 com evolução da neoplasia. À medida que aumenta o grau da lesão, há um  
688 aumento significativo na expressão das citocinas inibitórias como: IL-10, IL-4 e  
689 TGF- $\beta$  1, 2 e 3. A presença de IL-4 caracteriza o perfil Th2, enquanto a expressão  
690 de TGF- $\beta$  associado ou não a outras citocinas, que não seja a IL-4, caracteriza  
691 o perfil Treg, sendo estas citocinas avaliadas por Real Time PCR (RT-PCR).  
692 MACHADO (2011), utilizando o IFN  $\alpha$ -2b intralesional no tratamento de pacientes  
693 com NIC II e III, observou que das 13 pacientes, 46,15% apresentaram boa  
694 resposta ao tratamento com desaparecimento da lesão de alto grau. E também  
695 utilizando a técnica de imunohistoquímica para caracterizar infiltrados de células  
696 imunes no estroma cervical de biópsias de pacientes com NIC II e III tratadas  
697 com IFN  $\alpha$ -2b, concluíram que todas as pacientes com NIC II e III demonstraram  
698 a existência de linfócitos T CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, no entanto, após o tratamento 100%  
699 dos casos com má resposta tinham CD3<sup>+</sup> com marcação forte.

700 A presença de células NK no microambiente tumoral, podem contribuir para  
701 potencializar respostas imunes adaptativas, além de possuir alto poder de  
702 citotoxicidade (CROUSE et al., 2015a). Dentre os mecanismos clássicos de  
703 respostas imunes efectoras, alguns tumores têm mostrado a presença de células  
704 NK e esta infiltração associou um prognóstico favorável em pacientes com  
705 câncer (WOO; CORRALES; GAJEWSKI, 2015).

706 Nos últimos 15 anos, um vasto número de receptores de ativação e inibitórios  
707 codificado para NK foram descobertos. Entre os receptores de ativação, o  
708 membro do grupo 2D natural killer (NKG2D) que é uma glicoproteína  
709 transmembrana do tipo II ancorada a um homodímero ligado por ponte dissulfeto,  
710 é expressa na superfície de quase todas as células NK. Entretanto foram  
711 também descobertos em células T CD8<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup>, células T γδ<sup>+</sup>, células NKT, e em  
712 algumas células T CD4<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup>. Os ligantes de NKG2D são frequentemente  
713 expressos em células tumorais primárias, linhagens de células tumorais e células  
714 infectadas por alguns agentes patogênicos, os quais tornam-se sensíveis as  
715 células NK estimulando-as ao combate de células que expressam estes ligantes  
716 (SEREN BERNARDONE, 2008).

717 Observamos em nosso estudo que os receptores de ativação das células NK  
718 nas pacientes tratadas com interferon não apresentaram resultados significativos  
719 elucidando que estes receptores não foram recrutados na estimulação, como  
720 estas células dependem da ligação destes receptores, não havendo esta ligação  
721 sua função é inibida.

722 Além dos receptores ativatórios, as células NKT começaram a receber  
723 atenção relacionada a imunidade tumoral, visto que estas células e células T γδ<sup>+</sup>  
724 podem formar uma ligação entre a imunidade inata e adaptativa, mas não têm a  
725 capacidade de estabelecer clones de memória específicos para o antígeno e o  
726 tipo de resposta montada por elas, é referida somente como imunidade de  
727 transição (CARNAUD et al., 1999; SEREN BERNARDONE, 2008).

728 Para compreender a ativação das células NKT estudos desenvolvidos  
729 sugerem que elas requerem o reconhecimento específico do TCR para serem  
730 ativadas, mas a função dos receptores envolvidos na ativação é desconhecida  
731 devido estas possuírem grande diversidade na expressão do TCR indicando  
732 serem convencionais ao complexo peptídico MHC (GODFREY et al., 2000).

733 As células NKT ainda não possuem papel bem esclarecidos, autores afirmam  
734 que células NKT exercem função de regulação da resposta imune,  
735 provavelmente através da sua capacidade de liberar prontamente grandes  
736 quantidades de IL-4 orientando respostas direcionadas ao perfil Th2 (CARNAUD  
737 et al., 1999).

738 Diante das buscas em estabelecer o perfil das células NKT um outro subtipo  
739 de células foi descoberto, são as células iNKT (Natural Killers Invariantes) que  
740 por sua vez possuem também três subtipos distintos entre si, NKT1, NKT2 e  
741 NKT17. Em estudos realizados em camundongos, Lee et al. (2015),  
742 evidenciaram que anatomicamente as células NKT2 estão presentes no timo e  
743 são produtoras de Interleucina-4 (IL-4) levando a um perfil imunossupressor.

744 Um estudo realizado com 201 pacientes normais, e diagnosticadas com NIC  
745 III, Hu et al. (2015), constatou um aumento significativo de células iNKT em  
746 biópsias NIC II e III e um aumento na expressão de IFN- $\gamma$ , concluindo que as  
747 células iNKT podem desempenhar um papel importante na imunossupressão,  
748 porém a expressão de IFN- $\gamma$  estaria relacionado com a infecção pelo HPV.

749 Neste mesmo estudo Hu e seus colaboradores, sugerem que uma redução  
750 das células iNKT nas lesões de colo do útero seria um método viável para  
751 impedir o desenvolvimento de Neoplasias Intraepiteliais Cervicais, sendo esta a  
752 primeira publicação afirmando que as células iNKT funcionam como supressoras  
753 da imunidade em infecções pelo HPV de alto risco (HU et al., 2015).

754 O nosso resultado obtido, demonstrou significância estatística na intensidade  
755 de fluorescência para as células NKT invariantes nas pacientes com má resposta  
756 ao início do tratamento. Deste modo estas células por induzir um perfil  
757 imunossupressor, podem estar associadas na deficiência em ativar células NK  
758 ao tratamento com interferon, inferindo que, a quantidade sistêmica destas  
759 células, esteja potencialmente relacionada induzindo um mecanismo de escape  
760 tumoral em células neoplásicas.

761 Estudos realizados para avaliar respostas antitumorais envolvendo células  
762 NKT invariantes no sangue periférico, tentam elucidar as propriedades  
763 funcionais na corrente sanguínea, e sua interação entre a imunidade do  
764 hospedeiro com a progressão do câncer (MOTOHASHI; NAKAYAMA, 2008).

765 As células dendríticas principais apresentadoras de antígenos da imunidade  
766 inata podem contribuir na expansão e ativação das células NKT. Em seus

767 estudos, Ishikawa et al. (2006), investigaram em pacientes com câncer de  
768 pulmão o perfil de resposta das células dendríticas (DCs) pulsadas com  $\alpha$ -  
769 GalCer, e concluíram que a administração das DCs pulsadas nos pacientes com  
770 a doença avançada, pode estimular a ativação e expansão dessas células  
771 estabelecendo a correlação entre elas.

772 Atualmente várias propriedades imunossupressoras no microambiente  
773 tumoral têm sido descobertas e sabe-se que elas podem afetar a homeostase  
774 da imunidade sistêmica. Entretanto, linfócitos T citolíticos (CTLs) específicos  
775 para o tumor foram identificados como potentes efetores da resposta imune  
776 antitumoral, assim, células do tipo Th1 que secretam IFN- $\gamma$  e IL-2 são críticas  
777 para gerar CTLs específicos duráveis, porém, células do tipo Th2, que produzem  
778 IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  regulam de forma negativa estas respostas da imunidade  
779 tipo1 (ZHAO et al., 2015).

780 Michelin et al. (2015), em seus estudos demonstrou que pacientes tratadas  
781 com interferon- $\alpha$  2b peguado que não obtiveram regressão da lesão, possui  
782 altos níveis de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  na terceira aplicação favorecendo a um estado  
783 de imunossupressão local associado a uma derregulação de várias moléculas  
784 da resposta imune.

785 Moléculas de adesão desempenham um papel de interação com outras  
786 células do sistema imune. O CD50 (ICAM-3) age como contra-receptor para  
787 CD11a / CD18 (LFA-1) (CARPENITO; PYSZNIAK; TAKEI, 1997). Dos processos  
788 envolvidos com esta molécula incluem o reconhecimento antigênico, estímulo  
789 para a produção de imunoglobulina, apresentação antigênica, migração celular  
790 e citotoxicidade. O CD50 na superfície das células T, aumenta a sinalização  
791 através de CD3 que funciona como uma molécula co-estimuladora para células  
792 T no passo inicial da ativação (DE FOUGEROLLES; QIN; SPRINGER, 1994; DE  
793 MARTINIS et al., 2000).

794 Os nossos resultados demonstram que o CD50 possui uma intensidade de  
795 fluorescência significativa nas pacientes com má resposta ( $p=0,0205$ ) sugerindo  
796 que em condições patológicas os linfócitos que fazem a interação entre a  
797 imunidade inata e adaptativa são recrutados para eliminar qualquer tipo de  
798 infecção e em casos onde a lesão é mais grave, como NICs II e III, sugere ser  
799 uma resposta de caráter inflamatório sistêmico e não local. Como as pacientes  
800 com boa resposta demonstram ter níveis de intensidade sistêmicos menores ao

801 início do tratamento, é sugestivo que a maior intensidade do CD50 observada  
802 nas pacientes com má resposta não se relaciona com o recrutamento de células  
803 para o local de infecção nestas pacientes.

804 Teunissen e colaboradores (1995), analisaram em culturas com células de  
805 Langerhans purificadas que a adição simultânea de anti-ICAM-1 (CD54) e anti-  
806 ICAM-3 (CD50) sinergicamente inibem respostas por células T, porém o bloqueio  
807 total ainda não foi descrito.

808 Além das moléculas de adesão outras moléculas acessórias como o CD80  
809 expresso na membrana de células apresentadoras de antígeno (APCs)  
810 estimulam respostas imunes específicas para combater células modificadas. O  
811 sinal coestimulatório gerado pelo CD80 através da ligação ao CD28 são críticos  
812 para iniciação da resposta imune envolvendo células T. Em contrapartida a  
813 ligação do CD80 ao CTLA-4 gera sinais inibitórios para a ativação de células T  
814 (VASILEVKO et al., 2002).

815 Em um estudo realizado *in vitro* foi demonstrado que células NK em anergia  
816 podem expressar o CD86 e quando ativadas expressam ambos os receptores  
817 CD80 e CD86, sugerindo que elas podem ser moduladas por CTLA-4 (HANNA  
818 et al., 2005).

819 A interação do CD80 com células NK podem ser favoráveis a respostas  
820 imunes efectoras ou não. Um estudo avaliou a ação das células NK pela  
821 vacinação com DCs e evidenciaram mecanismos indiretos da ação dessas  
822 células pela ocorrência na redução da apresentação de antígenos e  
823 consequentemente redução nas respostas celulares T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>  
824 aumentando a persistência viral em camundongos Ly49H<sup>+</sup> (ANDREWS et al.,  
825 2010; CROUSE et al., 2015b; HAYAKAWA et al., 2004).

826 Em suas observações Tu et al. (2014), relata que a perda da expressão do  
827 MHC classe I torna as células tumorais sensíveis as NKs, mas em contraste a  
828 perda parcial desta expressão permite a evasão das células tumorais por células  
829 T e a inibição de células NK. Isto ocorre, devido à perda do alelo para  
830 apresentação do antígeno.

831 Neste estudo os nossos resultados demonstraram que a intensidade de  
832 fluorescência para o CD80 (p=0,0205) nas pacientes com boa resposta ao  
833 tratamento é menor se comparado as pacientes que apresentaram má resposta.  
834 Isto sugere que a falha na ativação das células NK possa estar associada a maior

835 intensidade de fluorescência para o CD80 no sangue periférico no início do  
836 tratamento com interferon. Uma evidência observada apesar de não significativa  
837 é que ao longo do tratamento as pacientes com má resposta tendem a diminuir  
838 a intensidade de fluorescência para a marcação do CD80 evidenciando a  
839 tendência das células NKT invariantes induzir um perfil imunossupressor.

840 Os processos envolvendo a interação entre moléculas coestimulatória e  
841 células iNKT foram estudados por Zheng e colaboradores (2008), demonstrando  
842 no timo, baço e fígado de camundongos knockout para B7-1/2, que o  
843 desenvolvimento, maturação e funções das células NKT são modulados pela via  
844 coestimulatória, porém sistemicamente estas interações não foram elucidadas.

845 Nosso estudo demonstra que a imunoterapia com interferon é algo promissor  
846 no tratamento de neoplasias intraepiteliais cervicais, visto que pacientes  
847 obtiveram boa resposta ao tratamento. Porém, os nossos resultados apontaram  
848 que em casos de não regressão da lesão cervical, dos mecanismos estimulados,  
849 as células NKT invariantes associadas as moléculas CD50 e CD80 estão  
850 envolvidas em respostas imunes não efetoras diante do tratamento com  
851 interferon. Contudo nosso trabalho é um marco no estudo de células NK em  
852 pacientes com NIC submetidos a imunoterapia com IFN alpha 2b peguilado, e  
853 os dados obtidos neste trabalho podem contribuir para a compreensão de  
854 mecanismos imunológicos envolvidos na regressão de tumores e também nos  
855 casos de tratamento imunoterápico malsucedido. As moléculas avaliadas neste  
856 estudo podem ser utilizadas para predizer boas e más respostas em casos de  
857 tratamento com IFN alpha 2b peguilado em pacientes com câncer. Apesar dos  
858 bons resultados terem sido observados nas pesquisas realizadas, pudemos  
859 elucidar neste estudo que más respostas ao tratamento, correlaciona-se com a  
860 presença de células NKT invariantes associada a molécula de adesão e  
861 coestimulatória CD50 e CD80, sugerindo que em conjunto elas podem induzir  
862 um estado fisiopatológico imunossupressor, porém estudos envolvendo a  
863 imunoterapia com interferon e células NK são necessários para esclarecer os  
864 mecanismos envolvidos em condições de falha ao tratamento.



*7 Conclusão*

**CONCLUSÃO**

865 1- Na avaliação e identificação dos receptores NKG2D, NKT, KIR, CD30 e  
866 citocinas intracelulares IFN- $\gamma$  e IL-10 os resultados demonstraram que  
867 sistemicamente as células NK não foram ativadas nas pacientes com NIC II e III  
868 frente a imunoterapia com interferon alpha 2b peguilado para combater a lesão  
869 neoplásica.

870 2- Na avaliação das moléculas de adesão CD50, CD54, CD102 e as  
871 moléculas coestimulatórias CD80 e CD86, a molécula de adesão CD50 e  
872 coestimulatória CD80 apresentaram envolvimento na resposta por células NK  
873 nas pacientes com NIC II e III tratadas com interferon alpha 2b peguilado.

874 3- Na comparação e determinação do perfil de resposta concluimos que as  
875 células NKT invariáveis junto as moléculas CD50 e CD80 desenvolvem um perfil  
876 imunossupressor em pacientes com níveis sistêmicos elevado para estas  
877 proteínas, estando associados ao progressão da lesão neoplásica nas que não  
878 obtiveram boa resposta ao tratamento, assim o aumento da intensidade de  
879 fluorescência para o receptor de células NKT invariáveis, CD50 (ICAM-3) e  
880 CD80 (B-7) predispõem a um perfil imunossupressor em pacientes com NIC II e  
881 III tratadas com interferon- $\alpha$  2b peguilado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7ª edição ed. Rio de Janeiro - RJ: Elsevier Inc., 2012.

ANDREWS, D. M. et al. Innate immunity defines the capacity of antiviral T cells to limit persistent infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 6, p. 1333–1343, 2010.

ANFOSSI, N. et al. Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I. **Immunity**, v. 25, n. 2, p. 331–342, 2006.

BELARDELLI, F. et al. Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 2, p. 119–134, 2002.

BELINSON, J. L. et al. Cervical cancer screening by simple visual inspection after acetic acid. **Obstetrics and gynecology**, v. 98, n. 3, p. 441–444, 2001.

BOCCARDO, E.; LEPIQUE, A. P.; VILLA, L. L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 11, p. 1905–1912, 2010.

BOSCH, F.; MUÑOZ, N.; SANJOSÉ, S. Human papillomavirus and other risk factors for cervical cancer. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 51, n. 6-7, p. 268–75, 1997.

BOSCH, F. X.; QIAO, Y. L.; CASTELLSAGUE, X. CHAPTER 2 The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. S8–S21, 2006.

BRENNAN, P. J.; BRIGL, M.; BRENNER, M. B. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 2, p. 101–17, 2013.

BRESTOVAC, B. et al. Human papillomavirus, high-grade intraepithelial neoplasia and killer immunoglobulin-like receptors: a Western Australian cohort study. **Infectious agents and cancer**, v. 8, n. 1, p. 33, 2013.

BURD, E. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 1, p. 1–17, 2003.

CARNAUD, C. et al. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)**, v. 163, n. 9, p. 4647–4650, 1999.

CARPENITO, C.; PYSZNIAK, A M.; TAKEI, F. ICAM-2 provides a costimulatory signal for T cell stimulation by allogeneic class II MHC. **Scand J Immunol**, v. 45, n. 3, p. 248–254, 1997.

CASTELLSAGUÉ, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 110, n. 3 SUPPL.2, p. 4–7, 2008.

CHEN, F. et al. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2015.

CHILL, J. H. et al. The human type I interferon receptor: NMR structure reveals the molecular basis of ligand binding. **Structure (London, England : 1993)**, v.

11, n. 7, p. 791–802, 2003.

CONNOR, J. M.; HARTENBACH, E. M. M. Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Global Library of Women's Medicine**, p. 1–21, 2008.

CROUSE, J. et al. NK cells regulating T cell responses: mechanisms and outcome. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 1, p. 49–58, 2015a.

CROUSE, J. et al. NK cells regulating T cell responses: mechanisms and outcome. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 1, p. 49–58, 2015b.

CUZICK, J. et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 119, n. 5, p. 1095–1101, 2006.

DE FOUGEROLLES, A R.; QIN, X.; SPRINGER, T. A. Characterization of the function of intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 2, p. 619–29, 1994.

DE MARTINIS, M. et al. Adhesion molecules on peripheral blood lymphocyte subpopulations in the elderly. **Life sciences**, v. 68, n. 2, p. 139–151, 2000.

DONNELLY, R. P. et al. The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. **Journal of leukocyte biology**, v. 76, n. 2, p. 314–321, 2004.

DUNN, G. P.; KOEBEL, C. M.; SCHREIBER, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 11, p. 836–848, 2006.

ELSHEIKH, T. M.; KIRKPATRICK, J. L.; WU, H. H. The significance of “low-grade squamous intraepithelial lesion, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion” as a distinct squamous abnormality category in Papanicolaou tests. **Cancer**, v. 108, n. 5, p. 277–281, 2006.

FARAG, S. S.; CALIGIURI, M. A. Human natural killer cell development and biology. **Blood Reviews**, v. 20, n. 3, p. 123–137, 2006.

GAO, J. et al. Mechanism of Action of IL-7 and Its Potential Applications and Limitations in Cancer Immunotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 5, p. 10267–10280, 2015.

GARCIA-IGLESIAS, T. et al. Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. **BMC cancer**, v. 9, p. 186, 2009.

GODFREY, D. I. et al. NKT cells: Facts, functions and fallacies. **Immunology Today**, v. 21, n. 11, p. 573–583, 2000.

GODÓ, M.; SESSLER, T.; HAMAR, P. Role of invariant natural killer T (iNKT) cells in systemic lupus erythematosus. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 18, p. 1778–1787, 2008.

GROH, V. et al. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. **Nature**, v. 419, n. 6908, p. 734–738, 2002.

HANNA, J. et al. Proteomic analysis of human natural killer cells: insights on new

potential NK immune functions. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 4, p. 425–431, 2005.

HARLIN, H. et al. The CD16- CD56(bright) NK cell subset is resistant to reactive oxygen species produced by activated granulocytes and has higher antioxidative capacity than the CD16+ CD56(dim) subset. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, n. 7, p. 4513–4519, 2007.

HAYAKAWA, Y. et al. NK Cell TRAIL Eliminates Immature Dendritic Cells In Vivo and Limits Dendritic Cell Vaccination Efficacy. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 1, p. 123–129, 2004.

HU, T. et al. Accumulation of invariant NKT cells with increased IFN- $\gamma$  production in persistent high-risk HPV-infected high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Diagnostic Pathology**, v. 10, n. 1, p. 20, 2015.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. **Journal of leukocyte biology**, v. 71, n. 6, p. 907–920, 2002.

IKEDA, H.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The roles of IFN $\gamma$  in protection against tumor development and cancer immunoediting. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 2, p. 95–109, 2002.

INCA. **Estimativa Incidência de câncer no Brasil - 2014**. [s.l: s.n.].

IRVINE, D. J.; SWARTZ, M. A; SZETO, G. L. Engineering synthetic vaccines using cues from natural immunity. **Nature materials**, v. 12, n. 11, p. 978–90, 2013.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature Immunology**, v. 16, n. 4, p. 343–353, 19 mar. 2015.

JAEGER, B. N.; VIVIER, E. Natural Killer Cell Tolerance: Control by Self or Self-Control? **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 3, p. a007229–a007229, 1 mar. 2012.

JANE J. KIM, PH.D., AND SUE J. GOLDIE, M.D., M. P. H. Health and Economic Implications of HPV Vaccination in the United States. **The New England journal of medicine**, v. 359, n. 19, p. 821–832, 2008.

JUNO, J. A.; KEYNAN, Y.; FOWKE, K. R. Invariant NKT Cells: Regulation and Function during Viral Infection. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 8, 2012.

KJAER, S. K. et al. Human papillomavirus--the most significant risk determinant of cervical intraepithelial neoplasia. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 65, n. 5, p. 613–619, 1998.

KOUTSKY, L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. **The American journal of medicine**, v. 102, n. 5A, p. 3–8, 1997.

KUDOH, A. et al. Human papillomavirus type-specific persistence and reappearance after successful conization in patients with cervical intraepithelial neoplasia. **International Journal of Clinical Oncology**, 2015.

LANIER, L. L. Natural killer cell receptor signaling. **Current Opinion in Immunology**, v. 15, n. 3, p. 308–314, 2003.

- LASFAR, A. A New Ally for Interferon-alpha in Cancer Therapy. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 03, n. 04, p. 3–4, 2012.
- LASFAR, A. et al. Characterization of the Mouse IFN-lamb ligand-receptor System: IFN-lamb5 Exhibit Antitumor Activity against B16 Melanoma. **Journal of General Virology**, v. 66, n. 1, p. 4468–4477, 2006.
- LASFAR, A. Characterization of the Mouse IFN- Ligand-Receptor System: IFN-5 Exhibit Antitumor Activity against B16 Melanoma. **Cancer Research**, v. 66, n. 8, p. 4468–4477, 15 abr. 2006.
- LESTERHUIS, W. J.; HAANEN, J. B. A G.; PUNT, C. J. A. Cancer immunotherapy--revisited. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 10, n. 8, p. 591–600, 2011.
- MASSAD, L. S. et al. 2012 Updated Consensus Guidelines for the Management of Cervical Cancer Screening Test and Cancer Precursors. **American Society for Colposcopy and Cervical Pathology**, v. 17, n. 5, p. S1–S27, 2013.
- MATSUKURA, T.; SUGASE, M. Pitfalls in the epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer using polymerase chain reaction: Driver and passenger. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 18, n. 5, p. 1042–1050, 2008.
- MELLMAN, I.; COUKOS, G.; DRANOFF, G. Cancer immunotherapy comes of age. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 480–489, 2011.
- MICHOR, F.; IWASA, Y.; NOWAK, M. A. Dynamics of cancer progression. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 3, p. 197–205, 2004.
- MONSONEGO, J. et al. Cervical cancer control, priorities and new directions. **International Journal of Cancer**, v. 108, n. 3, p. 329–333, 2004.
- MORETTA, L. Dissecting CD56dim human NK cells. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3689–3691, 2010.
- MOTOHASHI, S.; NAKAYAMA, T. Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer. **Cancer Science**, v. 99, n. 4, p. 638–645, 2008.
- MUÑOZ, N. Human papillomavirus and cancer: The epidemiological evidence. **Journal of Clinical Virology**, v. 19, n. 1-2, p. 1–5, 2000.
- MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 518–527, 2003.
- NAYAR, R.; WILBUR, D. C. The Pap test and Bethesda 2014. **Cancer Cytopathology**, n. May, p. n/a–n/a, 2015.
- NELSON, R. P.; BALLOW, M. Immunomodulation and immunotherapy: drugs, cytokines, cytokine receptors, and antibodies. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 111, n. 2 Suppl, p. S720–S743, 2003.
- NOVICK, D. et al. The neutralization of type I IFN biologic actions by anti-IFNAR-2 monoclonal antibodies is not entirely due to inhibition of Jak-Stat tyrosine phosphorylation. **Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 20, n. 11, p. 971–982, 2000.

- PARMAR, S.; PLATANIAS, L. C. Interferons: mechanisms of action and clinical applications. **Current opinion in oncology**, v. 15, n. 6, p. 431–439, 2003.
- PINTO, Á. P.; TULIO, S.; CRUZ, O. R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 1, p. 73–78, 2002.
- PRATA, T. T. M. et al. Local immunosuppression induced by high viral load of human papillomavirus: characterization of cellular phenotypes producing interleukin-10 in cervical neoplastic lesions. **Immunology**, p. 1–9, jun. 2015.
- RIVOIRE, W. A.; CAPP, E.; CORLETA, H. V. E. Bases Moleculares da Oncogênese Cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 2, p. 179–184, 2001.
- RONCO, L. V. et al. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes and Development**, v. 12, n. 13, p. 2061–2072, 1998.
- SADLER, L. et al. Treatment for cervical intraepithelial neoplasia and risk of preterm delivery. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 291, n. 17, p. 2100–2106, 2004.
- SAMUEL, C. E. Antiviral Actions of Interferons. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 778–809, 2001.
- SAUVAGET, C. et al. Accuracy of visual inspection with acetic acid for cervical cancer screening. **International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, v. 113, n. 1, p. 14–24, 2011.
- SCOTT, A. M.; ALLISON, J. P.; WOLCHOK, J. D. **Monoclonal antibodies in cancer therapy. Cancer immunity**, 2012. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6366145](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6366145)>
- SEREN BERNARDONE, I. Role of NK cells and adaptive immunity in “immunoediting”: Recent developments. **Inmunología**, v. 27, n. 3, p. 141–146, 2008.
- SHINGLETON, H. M. et al. Human Cervical Intraepithelial Neoplasia: Fine Structure of Dysplasia and Carcinoma In Situ Human Cervical Intraepithelial Neoplasia: Fine Structure of Dysplasia and Carcinoma In Situ1. **Cancer Research**, v. 28, n. April, p. 695–706, 1968.
- SOLOMON, D. The 2001 Bethesda System: Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. **Jama**, v. 287, n. 16, p. 2114, 2002.
- STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine**, v. 24, n. SUPPL. 1, p. 16–22, 2006.
- TAKAOKA, A.; YANAI, H. Interferon signalling network in innate defence. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 907–922, 2006.
- THEOFILOPOULOS, A. N. et al. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. **Annual review of immunology**, v. 23, p. 307–336, 2005.
- VAN BOXEL-DEZAIRE, A. H. H.; RANI, M. R. S.; STARK, G. R. Complex Modulation of Cell Type-Specific Signaling in Response to Type I Interferons.

**Immunity**, v. 25, n. 3, p. 361–372, 2006.

VAN DER SLUIS, T. C. et al. New approaches in vaccine-based immunotherapy for human papillomavirus-induced cancer. **Current Opinion in Immunology**, v. 35, p. 9–14, 2015.

VAN KAER, L.; PAREKH, V. V.; WU, L. Invariant natural killer T cells: Bridging innate and adaptive immunity. **Cell and Tissue Research**, v. 343, n. 1, p. 43–55, 2011.

VAN SETERS, M. et al. Treatment of vulvar intraepithelial neoplasia with topical imiquimod. **The New England journal of medicine**, v. 358, n. 14, p. 1465–1473, 2008.

VASILEVKO, V. et al. T-Cell Proliferation after Activation with Suboptimal Doses of PHA. **DNA and Cell Biology**, v. 21, n. 3, p. 137–149, 2002.

VIVIER, E. What is natural in natural killer cells? **Immunology Letters**, v. 107, n. 1, p. 1–7, 2006.

VIVIER, E.; UGOLINI, S. Natural killer cells: From basic research to treatments. **Frontiers in Immunology**, v. 2, n. JUN, p. 2–5, 2011.

WHO. **World Health Organization (WHO)**. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 12 jul. 2015.

WIRA, C. R. et al. The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. **Nature Reviews Immunology**, v. 72, n. 2, p. 217–230, 2015.

WOO, S.-R.; CORRALES, L.; GAJEWSKI, T. F. Innate Immune Recognition of Cancer. **Annual Review of Immunology**, v. 33, n. 1, p. 445–474, 21 mar. 2015.

ZHAO, P. et al. Dendritic cell immunotherapy combined with cytokine-induced killer cells promotes skewing toward Th2 cytokine profile in patients with metastatic non-small cell lung cancer. **International Immunopharmacology**, v. 25, n. 2, p. 450–456, 2015.

ZHOU, J. Advances and Prospects in Cancer Immunotherapy. **New Journal of Science**, v. 2014, p. 1–13, 2014.

ZITVOGEL, L. et al. Type I interferons in anticancer immunity. **Nature Reviews Immunology**, n. June, p. 5–9, 2015.



**ANEXO 1****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO**

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

Uberaba, ..... / ..... / .....

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

\_\_\_\_\_  
Documento de identidade

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador orientador

**Telefone de contato dos pesquisadores:**

\_\_\_\_\_

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

---

## ANEXO 2

### TERMO DE ESCLARECIMENTO

Você tem um tipo de doença denominada neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) de alto grau e está sendo convidada a participar do estudo “Uso do IFN peguilhado, resposta clínica e inflamatória, em pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau após tratamento com IFN  $\alpha$ -2b”. Os avanços na área de saúde ocorrem através de estudos como este, por isso sua participação é importante. O objetivo do estudo é:

- Tratar a doença com uma medicação denominada IFN  $\alpha$ -2b que será administrada no subcutâneo, ou seja, injeção “debaixo da pele” com auxílio de uma seringa e agulha.
- Será avaliada a resposta ao tratamento (por exemplo, se houve melhora ou não da lesão) e se analisará a importância do sistema de defesa durante o tratamento.

E caso você participe, será necessário coletar material para estudo que estamos propondo, além dos que já são normalmente coletados para os exames de rotina. É também importante que:

- A medicação será aplicada 1 vez por semana por 6 semanas (total de 06 aplicações);
- É de suma importância o comparecimento nos dias das aplicações para não prejudicar o tratamento;
- Você deverá usar método anticonceptivo durante o tratamento, pois a medicação pode acarretar vários danos para o bebê em caso de gestação no curso do tratamento.
- A medicação pode ocasionar alguns efeitos colaterais como: Febre, calafrios, mal-estar geral, mialgia, diminuição do apetite, diminuição dos leucócitos e plaquetas.
- No caso de não ocorrer melhora da doença ou mesmo se houver apenas melhora parcial você será prontamente encaminhada para tratamento cirúrgico complementar.

Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificada com um número.

## ANEXO 3

Dosagens dos marcadores das pacientes Boa Resposta Pré-Tratamento					
Paciente Número	Parameter	% Gate	GEO Mean	Diagnóstico Pré	Diagnóstico Pós
1	NKG2D	3,36	69,35	NIC III	NIC II
1	NKT	0,03	245,82	NIC III	NIC II
1	KIRNKT2	0,03	261,8	NIC III	NIC II
2	NKG2D	0,05	139,49	NIC II	EENC/HE
2	NKT	0,09	110,9	NIC II	EENC/HE
2	KIRNKT2	0,28	211,92	NIC II	EENC/HE
3	NKG2D	0,76	164,65	NIC II	NIC I
3	NKT	0,02	106,83	NIC II	NIC I
3	KIRNKT2	0,15	207,91	NIC II	NIC I
4	NKG2D	0,04	152,61	NIC III	CC/MI
4	NKT	45,43	85,97	NIC III	CC/MI
4	KIRNKT2	0,04	144,6	NIC III	CC/MI
5	NKG2D	0,23	196,32	NIC III	NIC II
5	NKT	0	N/A	NIC III	NIC II
5	KIRNKT2	0,19	205,58	NIC III	NIC II
6	NKG2D	0,12	382,91	NIC III	HPV
6	NKT	5,28	101,81	NIC III	HPV
6	KIRNKT2	0	N/A	NIC III	HPV
7	NKG2D	0,46	103,11	NIC III	CCL/MEM
7	NKT	0,19	138,79	NIC III	CCL/MEM
7	KIRNKT2	0,06	156,79	NIC III	CCL/MEM
8	NKG2D	3,67	87,28	NIC III	I/MEM
8	NKT	0,08	122,98	NIC III	I/MEM
8	KIRNKT2	0,91	109,76	NIC III	I/MEM
9	NKG2D	0,1	161,37	NIC III	MEASI
9	NKT	0,05	145,9	NIC III	MEASI
9	KIRNKT2	0,35	201,42	NIC III	MEASI
10	NKG2D	0,06	166,23	NIC II	CCL/MEM
10	NKT	2,28	105,51	NIC II	CCL/MEM
10	KIRNKT2	0,42	232,26	NIC II	CCL/MEM

Dosagem dos marcadores das pacientes Boa Resposta Pré-Tratamento							
Paciente Número	Parameter X	Parameter Y	% Gate	X GEO Mean	Y GEO Mean	Diagnóstico Pré	Diagnóstico Pós
1	NKT	CD30	N/A	95,82	11,51	NIC III	NIC II
1	NKG2D	IFN-gama	0,35	68,89	183,82	NIC III	NIC II
1	NKG2D	IL-10	0	N/A	N/A	NIC III	NIC II
1	CD102	CD50	0,32	96,29	172,01	NIC III	NIC II
1	CD54	CD50	N/A	N/A	N/A	NIC III	NIC II
1	CD86	CD80	0,13	66,86	164,74	NIC III	NIC II
2	NKT	CD30	0	216,11	N/A	NIC II	EENC/HE
2	NKG2D	IFN-gama	0,6	92,17	120,04	NIC II	EENC/HE
2	NKG2D	IL-10	0	61,96	N/A	NIC II	EENC/HE
2	CD102	CD50	4,78	65,86	143,9	NIC II	EENC/HE
2	CD54	CD50	4,45	57,36	141,49	NIC II	EENC/HE
2	CD86	CD80	6,22	43,65	436,93	NIC II	EENC/HE
3	NKT	CD30	0,02	245,82	106,5	NIC II	NIC I
3	NKG2D	IFN-gama	1,76	50,64	142,87	NIC II	NIC I
3	NKG2D	IL-10	0,01	155,38	119,71	NIC II	NIC I
3	CD102	CD50	2,47	77,36	140,51	NIC II	NIC I
3	CD54	CD50	2,63	73,05	141,88	NIC II	NIC I
3	CD86	CD80	0,18	64,76	330,48	NIC II	NIC I
4	NKT	CD30	0	85,97	N/A	NIC III	CC/MI
4	NKG2D	IFN-gama	0,09	63,92	209,55	NIC III	CC/MI
4	NKG2D	IL-10	0,04	59,62	302,32	NIC III	CC/MI
4	CD102	CD50	0,04	49,14	101,82	NIC III	CC/MI
4	CD54	CD50	0	N/A	N/A	NIC III	CC/MI
4	CD86	CD80	0	66,31	156,18	NIC III	CC/MI
5	NKT	CD30	0,02	235,01	129,8	NIC III	NIC II
5	NKG2D	IFN-gama	0,67	84,92	231,18	NIC III	NIC II
5	NKG2D	IL-10	0,35	95,55	191,32	NIC III	NIC II
5	CD102	CD50	1,49	93,29	172,51	NIC III	NIC II
5	CD54	CD50	1	81,13	170,22	NIC III	NIC II
5	CD86	CD80	0,99	72	763,18	NIC III	NIC II
6	NKT	CD30	0,01	417,92	168,49	NIC III	HPV
6	NKG2D	IFN-gama	0,36	93,48	340,84	NIC III	HPV
6	NKG2D	IL-10	0,1	135,01	544,3	NIC III	HPV
6	CD102	CD50	0,12	159,5	182,84	NIC III	HPV
6	CD54	CD50	0,03	86,34	185,45	NIC III	HPV
6	CD86	CD80	0,07	115,82	266,95	NIC III	HPV
7	NKT	CD30	0,11	399,54	184,01	NIC III	CCL/MEM
7	NKG2D	IFN-gama	0,42	96,47	227,73	NIC III	CCL/MEM
7	NKG2D	IL-10	0,15	105,54	171,1	NIC III	CCL/MEM
7	CD102	CD50	0,25	86,1	173,35	NIC III	CCL/MEM
7	CD54	CD50	0,25	83,1	173,35	NIC III	CCL/MEM
7	CD86	CD80	0,17	111,77	295,93	NIC III	CCL/MEM
8	NKT	CD30	0	98,8	N/A	NIC III	I/MEM
8	NKG2D	IFN-gama	3,5	40,38	126,53	NIC III	I/MEM
8	NKG2D	IL-10	0,73	54,97	157,22	NIC III	I/MEM
8	CD102	CD50	40,96	40,56	198,35	NIC III	I/MEM
8	CD54	CD50	7,93	39,48	193,47	NIC III	I/MEM
8	CD86	CD80	1,9	35,76	273,92	NIC III	I/MEM
9	NKT	CD30	N/A	N/A	N/A	NIC III	MEASI
9	NKG2D	IFN-gama	4,78	58,25	123,39	NIC III	MEASI
9	NKG2D	IL-10	N/A	N/A	N/A	NIC III	MEASI
9	CD102	CD50	N/A	N/A	N/A	NIC III	MEASI
9	CD54	CD50	N/A	N/A	N/A	NIC III	MEASI
9	CD86	CD80	N/A	N/A	N/A	NIC III	MEASI
10	NKT	CD30	N/A	562,34	N/A	NIC II	CCL/MEM
10	NKG2D	IFN-gama	0,06	160,35	336,78	NIC II	CCL/MEM
10	NKG2D	IL-10	N/A	330,77	N/A	NIC II	CCL/MEM
10	CD102	CD50	N/A	N/A	N/A	NIC II	CCL/MEM
10	CD54	CD50	N/A	N/A	N/A	NIC II	CCL/MEM
10	CD86	CD80	N/A	N/A	N/A	NIC II	CCL/MEM

Dosagens dos marcadores das pacientes Boa Resposta 3ª Aplicação					
Paciente Número	Parameter	% Gate	GEO Mean	Diagnóstico Pré	Diagnóstico Pós
1	NKG2D	0,04	210,97	NIC III	NIC II
1	NKT	57,58	134,72	NIC III	NIC II
1	KIRNKT2	1,24	140,63	NIC III	NIC II
2	NKG2D	0,05	187,13	NIC II	EENC/HE
2	NKT	55,37	88,09	NIC II	EENC/HE
2	KIRNKT2	0,03	179,43	NIC II	EENC/HE
3	NKG2D	5,95	61,38	NIC II	NIC I
3	NKT	0,08	116,52	NIC II	NIC I
3	KIRNKT2	0,14	141,51	NIC II	NIC I
4	NKG2D	10,07	44,28	NIC III	CC/MI
4	NKT	0,03	61,53	NIC III	CC/MI
4	KIRNKT2	2,86	92,3	NIC III	CC/MI
5	NKG2D	0,06	136,59	NIC III	NIC II
5	NKT	0,06	201,69	NIC III	NIC II
5	KIRNKT2	0,02	120,79	NIC III	NIC II
6	NKG2D	2,68	145,12	NIC III	HPV
6	NKT	52,29	139,06	NIC III	HPV
6	KIRNKT2	2,07	180,18	NIC III	HPV
7	NKG2D	0,32	274,99	NIC III	CCL/MEM
7	NKT	0,7	253,58	NIC III	CCL/MEM
7	KIRNKT2	0,19	228,99	NIC III	CCL/MEM
8	NKG2D	2,7	96,84	NIC III	I/MEM
8	NKT	0,05	106,74	NIC III	I/MEM
8	KIRNKT2	1,25	126,98	NIC III	I/MEM
9	NKG2D	0,06	111,4	NIC III	MEASI
9	NKT	0,1	99,82	NIC III	MEASI
9	KIRNKT2	0,45	131,57	NIC III	MEASI
10	NKG2D	0,13	322,93	NIC II	CCL/MEM
10	NKT	0,53	200,53	NIC II	CCL/MEM
10	KIRNKT2	0,19	215,23	NIC II	CCL/MEM

Dosagem dos marcadores das pacientes Boa Resposta 3ª Aplicação							
Paciente Número	Parameter X	Parameter Y	% Gate	X GEO Mean	Y GEO Mean	Diagnóstico Pré	Diagnóstico Pós
1	NKT	CD30	0	134,72	N/A	NIC III	NIC II
1	NKG2D	IFN-gama	0,12	52,8	166,08	NIC III	NIC II
1	NKG2D	IL-10	0	47,88	607,93	NIC III	NIC II
1	CD102	CD50	2,02	36,96	115,82	NIC III	NIC II
1	CD54	CD50	0,55	39,54	119,13	NIC III	NIC II
1	CD86	CD80	0,08	38,72	129,8	NIC III	NIC II
2	NKT	CD30	0	88,09	N/A	NIC II	EENC/HE
2	NKG2D	IFN-gama	0,75	59,03	171,05	NIC II	EENC/HE
2	NKG2D	IL-10	0,03	72,77	697,83	NIC II	EENC/HE
2	CD102	CD50	0,33	42,38	115,74	NIC II	EENC/HE
2	CD54	CD50	0,05	80,83	151,7	NIC II	EENC/HE
2	CD86	CD80	0	91,43	162,27	NIC II	EENC/HE
3	NKT	CD30	0	158,79	134,56	NIC II	NIC I
3	NKG2D	IFN-gama	0,3	73,79	144,78	NIC II	NIC I
3	NKG2D	IL-10	0,06	228,07	249,54	NIC II	NIC I
3	CD102	CD50	7,79	101,33	200,99	NIC II	NIC I
3	CD54	CD50	4,41	74,02	209,41	NIC II	NIC I
3	CD86	CD80	0,24	66,91	139,07	NIC II	NIC I
4	NKT	CD30	0	175,96	N/A	NIC III	CC/MI
4	NKG2D	IFN-gama	1,96	40,85	74,87	NIC III	CC/MI
4	NKG2D	IL-10	0,04	37,18	168,49	NIC III	CC/MI
4	CD102	CD50	9,77	45,49	152,5	NIC III	CC/MI
4	CD54	CD50	2,56	51,84	186,13	NIC III	CC/MI
4	CD86	CD80	3,81	35,38	344,02	NIC III	CC/MI
5	NKT	CD30	0,02	461,38	261,8	NIC III	NIC II
5	NKG2D	IFN-gama	0,08	52,1	123,82	NIC III	NIC II
5	NKG2D	IL-10	0	51,18	N/A	NIC III	NIC II
5	CD102	CD50	0	60,39	113	NIC III	NIC II
5	CD54	CD50	0,06	51,09	109,74	NIC III	NIC II
5	CD86	CD80	0,08	90,78	154,34	NIC III	NIC II
6	NKT	CD30	0	139,06	N/A	NIC III	HPV
6	NKG2D	IFN-gama	0,21	57,82	258,52	NIC III	HPV
6	NKG2D	IL-10	0,04	65,82	1512,47	NIC III	HPV
6	CD102	CD50	4,59	65,66	155,11	NIC III	HPV
6	CD54	CD50	1,72	61,73	142,04	NIC III	HPV
6	CD86	CD80	0,25	74,57	215,77	NIC III	HPV
7	NKT	CD30	0,13	469,76	411,7	NIC III	CCL/MEM
7	NKG2D	IFN-gama	0,32	183,57	306,34	NIC III	CCL/MEM
7	NKG2D	IL-10	0,11	315,09	371,8	NIC III	CCL/MEM
7	CD102	CD50	12	93,28	287,09	NIC III	CCL/MEM
7	CD54	CD50	7,68	132,33	314,29	NIC III	CCL/MEM
7	CD86	CD80	0,5	126,87	352,67	NIC III	CCL/MEM
8	NKT	CD30	1,6	721,18	114,85	NIC III	I/MEM
8	NKG2D	IFN-gama	3,77	50,58	140,32	NIC III	I/MEM
8	NKG2D	IL-10	0,47	77,18	483,23	NIC III	I/MEM
8	CD102	CD50	18,22	56,19	153,77	NIC III	I/MEM
8	CD54	CD50	4,74	54,77	173,86	NIC III	I/MEM
8	CD86	CD80	6,21	47,02	422,15	NIC III	I/MEM
9	NKT	CD30	0,02	973,38	88,17	NIC III	MEASI
9	NKG2D	IFN-gama	0,12	43,71	95,17	NIC III	MEASI
9	NKG2D	IL-10	0	48,02	N/A	NIC III	MEASI
9	CD102	CD50	0,65	47,91	129,43	NIC III	MEASI
9	CD54	CD50	1,25	60,32	132,26	NIC III	MEASI
9	CD86	CD80	5,17	47,24	505,27	NIC III	MEASI
10	NKT	CD30	0	232,18	N/A	NIC II	CCL/MEM
10	NKG2D	IFN-gama	0	293,39	330,93	NIC II	CCL/MEM
10	NKG2D	IL-10	0	293,39	339,82	NIC II	CCL/MEM
10	CD102	CD50	0,11	197,03	333,76	NIC II	CCL/MEM
10	CD54	CD50	0,09	265,95	265,95	NIC II	CCL/MEM
10	CD86	CD80	0,06	204,12	453,16	NIC II	CCL/MEM

Dosagens dos marcadores das pacientes Boa Resposta 6ª Aplicação					
Paciente Número	Parameter	% Gate	GEO Mean	Diagnóstico Pré	Diagnóstico Pós
1	NKG2D	0,04	237,14	NIC III	NIC II
1	NKT	0	96,36	NIC III	NIC II
1	KIRNKT2	0,8	229,9	NIC III	NIC II
2	NKG2D	0,42	185,57	NIC II	EENC/HE
2	NKT	0,02	166,98	NIC II	EENC/HE
2	KIRNKT2	0,28	192,73	NIC II	EENC/HE
3	NKG2D	0	59,74	NIC II	NIC I
3	NKT	0	100,1	NIC II	NIC I
3	KIRNKT2	0,02	437,14	NIC II	NIC I
4	NKG2D	2,75	50,19	NIC III	CC/MI
4	NKT	0,12	48,99	NIC III	CC/MI
4	KIRNKT2	1,7	77,62	NIC III	CC/MI
5	NKG2D	0,01	162,53	NIC III	NIC II
5	NKT	0,02	1351,63	NIC III	NIC II
5	KIRNKT2	0,08	289,35	NIC III	NIC II
6	NKG2D	0,51	180,52	NIC III	HPV
6	NKT	0,01	889,65	NIC III	HPV
6	KIRNKT2	0,45	177,77	NIC III	HPV
7	NKG2D	5,13	92,68	NIC III	CCL/MEM
7	NKT	0,31	199,76	NIC III	CCL/MEM
7	KIRNKT2	0,07	248,79	NIC III	CCL/MEM
8	NKG2D	1,23	96,55	NIC III	I/MEM
8	NKT	0,05	985,12	NIC III	I/MEM
8	KIRNKT2	0,21	412,32	NIC III	I/MEM
9	NKG2D	0,13	357,86	NIC III	MEASI
9	NKT	1,07	166,5	NIC III	MEASI
9	KIRNKT2	0,6	175,53	NIC III	MEASI
10	NKG2D	0,08	211,92	NIC II	CCL/MEM
10	NKT	0,08	260,92	NIC II	CCL/MEM
10	KIRNKT2	0,11	165,48	NIC II	CCL/MEM

Dosagem dos marcadores das pacientes Boa Resposta 6ª Aplicação							
Paciente Número	Parameter X	Parameter Y	% Gate	XGEO Mean	Y GEO Mean	Diagnóstico Pré	Diagnóstico Pós
1	NKT	CD30	0	96,36	N/A	NIC III	NIC II
1	NKG2D	IFN-gama	0,33	70,08	176,45	NIC III	NIC II
1	NKG2D	IL-10	0,04	71,05	1197,09	NIC III	NIC II
1	CD102	CD50	0,02	53,28	112,4	NIC III	NIC II
1	CD54	CD50	0,13	72,45	109,41	NIC III	NIC II
1	CD86	CD80	0,02	54,25	114,44	NIC III	NIC II
2	NKT	CD30	0,03	300,96	166,23	NIC II	EENC/HE
2	NKG2D	IFN-gama	0,56	52,34	173,04	NIC II	EENC/HE
2	NKG2D	IL-10	0,05	137,74	479,15	NIC II	EENC/HE
2	CD102	CD50	1,15	46,03	147,31	NIC II	EENC/HE
2	CD54	CD50	1,33	56,93	141,32	NIC II	EENC/HE
2	CD86	CD80	0,18	75,55	135,26	NIC II	EENC/HE
3	NKT	CD30	0	100,1	N/A	NIC II	NIC I
3	NKG2D	IFN-gama	0,05	66,95	377,19	NIC II	NIC I
3	NKG2D	IL-10	0,01	60,43	212,88	NIC II	NIC I
3	CD102	CD50	0,05	91,95	268,15	NIC II	NIC I
3	CD54	CD50	0,03	100,45	204,43	NIC II	NIC I
3	CD86	CD80	0	82,56	229,22	NIC II	NIC I
4	NKT	CD30	0,39	623,06	82,64	NIC III	CC/MI
4	NKG2D	IFN-gama	1,6	42,49	113,8	NIC III	CC/MI
4	NKG2D	IL-10	0	42,74	349,12	NIC III	CC/MI
4	CD102	CD50	7,5	52,72	115,71	NIC III	CC/MI
4	CD54	CD50	0,75	50,81	115,48	NIC III	CC/MI
4	CD86	CD80	0,49	40,22	215,28	NIC III	CC/MI
5	NKT	CD30	0,01	276,32	375,16	NIC III	NIC II
5	NKG2D	IFN-gama	0,36	77,52	162,16	NIC III	NIC II
5	NKG2D	IL-10	0,02	53,52	8316,14	NIC III	NIC II
5	CD102	CD50	0,08	87,67	153,13	NIC III	NIC II
5	CD54	CD50	0,63	63,9	133,06	NIC III	NIC II
5	CD86	CD80	0,19	56,96	498,16	NIC III	NIC II
6	NKT	CD30	0	78,32	N/A	NIC III	HPV
6	NKG2D	IFN-gama	0,63	61,63	183,1	NIC III	HPV
6	NKG2D	IL-10	0,02	110,4	397,75	NIC III	HPV
6	CD102	CD50	1,87	62,16	150,2	NIC III	HPV
6	CD54	CD50	0,78	57,24	152,93	NIC III	HPV
6	CD86	CD80	0,2	92,11	167,95	NIC III	HPV
7	NKT	CD30	0,02	588,21	321,97	NIC III	CCL/MEM
7	NKG2D	IFN-gama	0,17	166,6	241,44	NIC III	CCL/MEM
7	NKG2D	IL-10	0,02	3162,28	283,87	NIC III	CCL/MEM
7	CD102	CD50	9,18	110,42	279,16	NIC III	CCL/MEM
7	CD54	CD50	1,13	101,35	273,8	NIC III	CCL/MEM
7	CD86	CD80	0,71	106,73	470,78	NIC III	CCL/MEM
8	NKT	CD30	0,03	435,18	324,88	NIC III	I/MEM
8	NKG2D	IFN-gama	0,04	101,82	1420,18	NIC III	I/MEM
8	NKG2D	IL-10	0,02	101,36	1980,96	NIC III	I/MEM
8	CD102	CD50	0,11	121,26	545,26	NIC III	I/MEM
8	CD54	CD50	0,05	91,12	314,34	NIC III	I/MEM
8	CD86	CD80	0,02	128,64	421,7	NIC III	I/MEM
9	NKT	CD30	0,01	271,39	661,17	NIC III	MEASI
9	NKG2D	IFN-gama	0,71	270,32	562,66	NIC III	MEASI
9	NKG2D	IL-10	0,13	374,88	419,49	NIC III	MEASI
9	CD102	CD50	0	313,4	421,7	NIC III	MEASI
9	CD54	CD50	0	252,55	421,7	NIC III	MEASI
9	CD86	CD80	0,03	1226,14	3608,21	NIC III	MEASI
10	NKT	CD30	0,32	259,92	208,2	NIC II	CCL/MEM
10	NKG2D	IFN-gama	2,11	81,34	117,86	NIC II	CCL/MEM
10	NKG2D	IL-10	0,06	167,48	822,93	NIC II	CCL/MEM
10	CD102	CD50	0,99	60,11	131,96	NIC II	CCL/MEM
10	CD54	CD50	0,93	60,59	124,42	NIC II	CCL/MEM
10	CD86	CD80	0,86	67,58	302,12	NIC II	CCL/MEM



Dosagens dos marcadores das pacientes Má Resposta Pré-Tratamento					
Paciente Número	Parameter	% Gate	GEO Mean	Diagnóstico Pré	Diagnóstico Pós
1	NKG2D	0,08	156,08	NIC II	NIC II
1	NKT	66,82	276,14	NIC II	NIC II
1	KIRNKT2	3,2	260,04	NIC II	NIC II
2	NKG2D	1,18	243,39	NIC III	NIC III
2	NKT	0	N/A	NIC III	NIC III
2	KIRNKT2	0,33	267,85	NIC III	NIC III
3	NKG2D	0,02	523,3	NIC III	NIC III
3	NKT	0,05	314,81	NIC III	NIC III
3	KIRNKT2	0,27	316,23	NIC III	NIC III
4	NKG2D	0,28	223,62	NIC III	NIC III
4	NKT	0,24	262,85	NIC III	NIC III
4	KIRNKT2	1,85	268,43	NIC III	NIC III
5	NKG2D	0,76	116,31	NIC II	NIC II
5	NKT	0	N/A	NIC II	NIC II
5	KIRNKT2	0,25	118,54	NIC II	NIC II
6	NKG2D	0,04	170,01	NIC III	NIC III
6	NKT	0	N/A	NIC III	NIC III
6	KIRNKT2	0,45	186,95	NIC III	NIC III
7	NKG2D	0	N/A	NIC II	NIC II
7	NKT	0,13	151,93	NIC II	NIC II
7	KIRNKT2	0,16	311,39	NIC II	NIC II
8	NKG2D	0,02	700	NIC III	NIC III
8	NKT	0,15	243,94	NIC III	NIC III
8	KIRNKT2	0,65	153,9	NIC III	NIC III

Dosagen dos marcadores das pacientes Má Resposta Pré-Tratamento							
Paciente Número	Parameter X	Parameter Y	% Gate	X GEO Mean	Y GEO Mean	Diagnóstico Pré	Diagnóstico Pós
1	NKT	CD30	0	N/A	N/A	NIC II	NIC II
1	NKG2D	IFN-gama	0,86	77,56	160,17	NIC II	NIC II
1	NKG2D	IL-10	0,11	61,53	165,48	NIC II	NIC II
1	CD102	CD50	1,43	62,4	145,08	NIC II	NIC II
1	CD54	CD50	1,35	67,57	150,38	NIC II	NIC II
1	CD86	CD80	2,38	54,28	562,42	NIC II	NIC II
2	NKT	CD30	0,07	597,09	160,11	NIC III	NIC III
2	NKG2D	IFN-gama	0,34	125,72	258,89	NIC III	NIC III
2	NKG2D	IL-10	0,07	169,24	240	NIC III	NIC III
2	CD102	CD50	1,92	59,74	200,75	NIC III	NIC III
2	CD54	CD50	6,65	86,27	178,49	NIC III	NIC III
2	CD86	CD80	4,97	63,62	640,91	NIC III	NIC III
3	NKT	CD30	0,07	163,02	474	NIC III	NIC III
3	NKG2D	IFN-gama	0,22	87,22	317,37	NIC III	NIC III
3	NKG2D	IL-10	0,07	142,87	405,58	NIC III	NIC III
3	CD102	CD50	0,77	96,88	262,48	NIC III	NIC III
3	CD54	CD50	0,34	91,4	272,69	NIC III	NIC III
3	CD86	CD80	0,28	122,16	532,8	NIC III	NIC III
4	NKT	CD30	0,19	684,07	411	NIC III	NIC III
4	NKG2D	IFN-gama	0,67	112,19	231,08	NIC III	NIC III
4	NKG2D	IL-10	0,32	109,41	166,2	NIC III	NIC III
4	CD102	CD50	12,9	124,33	221,01	NIC III	NIC III
4	CD54	CD50	3,2	101	221,49	NIC III	NIC III
4	CD86	CD80	1,51	98,49	659,21	NIC III	NIC III
5	NKT	CD30	0,07	168,49	209,08	NIC II	NIC II
5	NKG2D	IFN-gama	1,86	94,65	265,9	NIC II	NIC II
5	NKG2D	IL-10	1,1	88,08	175,02	NIC II	NIC II
5	CD102	CD50	0,46	76,69	189,9	NIC II	NIC II
5	CD54	CD50	0,07	65,72	198,69	NIC II	NIC II
5	CD86	CD80	0,11	64,47	413,43	NIC II	NIC II
6	NKT	CD30	0	166,54	N/A	NIC III	NIC III
6	NKG2D	IFN-gama	1,21	64,57	167,03	NIC III	NIC III
6	NKG2D	IL-10	0,06	68,03	255,59	NIC III	NIC III
6	CD102	CD50	0,09	97,84	273,84	NIC III	NIC III
6	CD54	CD50	0,47	82,85	163,62	NIC III	NIC III
6	CD86	CD80	3,04	68,61	687,74	NIC III	NIC III
7	NKT	CD30	0,04	165,48	342,89	NIC II	NIC II
7	NKG2D	IFN-gama	0	N/A	138,15	NIC II	NIC II
7	NKG2D	IL-10	0	N/A	576,36	NIC II	NIC II
7	CD102	CD50	0,33	75,53	180,84	NIC II	NIC II
7	CD54	CD50	2,27	74,08	181,92	NIC II	NIC II
7	CD86	CD80	0,83	78,44	608,72	NIC II	NIC II
8	NKT	CD30	N/A	176,24	N/A	NIC III	NIC III
8	NKG2D	IFN-gama	N/A	151,25	N/A	NIC III	NIC III
8	NKG2D	IL-10	N/A	N/A	N/A	NIC III	NIC III
8	CD102	CD50	N/A	N/A	N/A	NIC III	NIC III
8	CD54	CD50	N/A	N/A	N/A	NIC III	NIC III
8	CD86	CD80	N/A	N/A	N/A	NIC III	NIC III

Dosagens dos marcadores das pacientes Má Resposta 3ª Aplicação					
Paciente Número	Parameter	% Gate	GEO Mean	Diagnóstico Pré	Diagnóstico Pós
1	NKG2D	5,4	107,67	NIC II	NIC II
1	NKT	32,23	393,25	NIC II	NIC II
1	KIRNKT2	1,17	284,36	NIC II	NIC II
2	NKG2D	0,75	174,26	NIC III	NIC III
2	NKT	0,01	429,35	NIC III	NIC III
2	KIRNKT2	0,27	235,25	NIC III	NIC III
3	NKG2D	0	N/A	NIC III	NIC III
3	NKT	0,09	664,15	NIC III	NIC III
3	KIRNKT2	0,11	420,94	NIC III	NIC III
4	NKG2D	1,22	138,33	NIC III	NIC III
4	NKT	0,31	162,34	NIC III	NIC III
4	KIRNKT2	4,83	186,39	NIC III	NIC III
5	NKG2D	0,11	353,33	NIC II	NIC II
5	NKT	34,05	140,97	NIC II	NIC II
5	KIRNKT2	0	N/A	NIC II	NIC II
6	NKG2D	0,23	183,57	NIC III	NIC III
6	NKT	0,02	164	NIC III	NIC III
6	KIRNKT2	0,69	132,34	NIC III	NIC III
7	NKG2D	2,72	153,81	NIC II	NIC II
7	NKT	0,59	145,39	NIC II	NIC II
7	KIRNKT2	0,69	201,96	NIC II	NIC II
8	NKG2D	2,69	134,53	NIC III	NIC III
8	NKT	0,16	152,27	NIC III	NIC III
8	KIRNKT2	0,82	138,14	NIC III	NIC III

Dosagem dos marcadores das pacientes Má Resposta 3ª Aplicação							
Paciente Número	Parameter X	Parameter Y	% Gate	X GEO Mean	Y GEO Mean	Diagnóstico Pré	Diagnóstico Pós
1	NKT	CD30	0,03	226,71	224,68	NIC II	NIC II
1	NKG2D	IFN-gama	0,18	120,25	399,09	NIC II	NIC II
1	NKG2D	IL-10	0,05	100,45	493,58	NIC II	NIC II
1	CD102	CD50	0,31	144,86	191,27	NIC II	NIC II
1	CD54	CD50	0,18	123,91	192,53	NIC II	NIC II
1	CD86	CD80	0,06	179,43	375,16	NIC II	NIC II
2	NKT	CD30	0,06	211,92	356,25	NIC III	NIC III
2	NKG2D	IFN-gama	0,49	64,28	122,71	NIC III	NIC III
2	NKG2D	IL-10	0,07	167,23	194,86	NIC III	NIC III
2	CD102	CD50	6,32	67,12	121,61	NIC III	NIC III
2	CD54	CD50	5,6	66,99	123,53	NIC III	NIC III
2	CD86	CD80	0,54	68,93	168,23	NIC III	NIC III
3	NKT	CD30	0	138,74	N/A	NIC III	NIC III
3	NKG2D	IFN-gama	0	N/A	134,44	NIC III	NIC III
3	NKG2D	IL-10	0	N/A	282,6	NIC III	NIC III
3	CD102	CD50	1,91	58,32	181,23	NIC III	NIC III
3	CD54	CD50	0,56	68,86	157,07	NIC III	NIC III
3	CD86	CD80	0,04	145,9	361,9	NIC III	NIC III
4	NKT	CD30	0,07	312,27	174,66	NIC III	NIC III
4	NKG2D	IFN-gama	0,15	68,6	157,95	NIC III	NIC III
4	NKG2D	IL-10	0	64,1	489,9	NIC III	NIC III
4	CD102	CD50	26,14	79,96	210,4	NIC III	NIC III
4	CD54	CD50	3,72	67,89	239,5	NIC III	NIC III
4	CD86	CD80	2,14	76,28	410,36	NIC III	NIC III
5	NKT	CD30	0	140,97	N/A	NIC II	NIC II
5	NKG2D	IFN-gama	0,15	73,27	151,25	NIC II	NIC II
5	NKG2D	IL-10	0	73,4	166,23	NIC II	NIC II
5	CD102	CD50	0,55	85,67	166,18	NIC II	NIC II
5	CD54	CD50	0,07	78,44	154,69	NIC II	NIC II
5	CD86	CD80	0,33	86,42	379,69	NIC II	NIC II
6	NKT	CD30	0,03	93,9	102,27	NIC III	NIC III
6	NKG2D	IFN-gama	0,57	64,64	143,23	NIC III	NIC III
6	NKG2D	IL-10	0,05	121,66	373,14	NIC III	NIC III
6	CD102	CD50	2,11	62,92	131,66	NIC III	NIC III
6	CD54	CD50	1,79	71,98	128,91	NIC III	NIC III
6	CD86	CD80	0,34	65,6	406,32	NIC III	NIC III
7	NKT	CD30	0,11	296,93	271,39	NIC II	NIC II
7	NKG2D	IFN-gama	2,32	85,36	158,5	NIC II	NIC II
7	NKG2D	IL-10	0,44	120,91	212,98	NIC II	NIC II
7	CD102	CD50	8,94	72,3	335,43	NIC II	NIC II
7	CD54	CD50	3,46	83,85	317,59	NIC II	NIC II
7	CD86	CD80	0,92	86,93	480,01	NIC II	NIC II
8	NKT	CD30	0,08	281,33	255,98	NIC III	NIC III
8	NKG2D	IFN-gama	0,86	81,43	123,56	NIC III	NIC III
8	NKG2D	IL-10	0,04	1113,97	314,81	NIC III	NIC III
8	CD102	CD50	3,39	60,84	183,35	NIC III	NIC III
8	CD54	CD50	2,36	76,05	196,63	NIC III	NIC III
8	CD86	CD80	3,64	59,1	638,87	NIC III	NIC III

Dosagens dos marcadores das pacientes Má Resposta 6ª Aplicação					
Paciente Número	Parameter	% Gate	GEO Mean	Diagnóstico Pré	Diagnóstico Pós
1	NKG2D	0,06	133,35	NIC II	NIC II
1	NKT	0	87,21	NIC II	NIC II
1	KIRNKT2	2,49	210,86	NIC II	NIC II
2	NKG2D	0	61,96	NIC III	NIC III
2	NKT	0	127,31	NIC III	NIC III
2	KIRNKT2	0,05	461,38	NIC III	NIC III
3	NKG2D	0,15	299,61	NIC III	NIC III
3	NKT	0	139,02	NIC III	NIC III
3	KIRNKT2	0,38	219,86	NIC III	NIC III
4	NKG2D	0,17	260,79	NIC III	NIC III
4	NKT	0,2	283,08	NIC III	NIC III
4	KIRNKT2	1,18	221,15	NIC III	NIC III
5	NKG2D	0,1	236,29	NIC II	NIC II
5	NKT	0,04	227,73	NIC II	NIC II
5	KIRNKT2	0,04	441,09	NIC II	NIC II
6	NKG2D	6,57	65,2	NIC III	NIC III
6	NKT	0,05	153,07	NIC III	NIC III
6	KIRNKT2	0,15	170,62	NIC III	NIC III
7	NKG2D	0,58	193,4	NIC II	NIC II
7	NKT	0	160,56	NIC II	NIC II
7	KIRNKT2	0,08	233,61	NIC II	NIC II
8	NKG2D	0,05	137	NIC III	NIC III
8	NKT	0,1	285,15	NIC III	NIC III
8	KIRNKT2	0,5	165,48	NIC III	NIC III

Dosagem dos marcadores das pacientes Má Resposta 6ª Aplicação							
Paciente Número	Parameter X	Parameter Y	% Gate	X GEO Mean	Y GEO Mean	Diagnóstico Pré	Diagnóstico Pós
1	NKT	CD30	0,19	37,23	120,95	NIC II	NIC II
1	NKG2D	IFN-gama	1,1	42,05	99,69	NIC II	NIC II
1	NKG2D	IL-10	0,07	119,35	1267,26	NIC II	NIC II
1	CD102	CD50	11,17	35,97	117,82	NIC II	NIC II
1	CD54	CD50	0,45	36,02	145,52	NIC II	NIC II
1	CD86	CD80	0,05	29,43	238,21	NIC II	NIC II
2	NKT	CD30	0,02	453,16	158,2	NIC III	NIC III
2	NKG2D	IFN-gama	0,15	60,35	452,22	NIC III	NIC III
2	NKG2D	IL-10	0,03	51,71	643,57	NIC III	NIC III
2	CD102	CD50	0,11	72,25	319,91	NIC III	NIC III
2	CD54	CD50	0,11	66,97	177,6	NIC III	NIC III
2	CD86	CD80	0,25	70,3	312,4	NIC III	NIC III
3	NKT	CD30	0	139,02	N/A	NIC III	NIC III
3	NKG2D	IFN-gama	0,62	184,64	505,94	NIC III	NIC III
3	NKG2D	IL-10	0,31	264,33	940,79	NIC III	NIC III
3	CD102	CD50	0,02	349,12	604,3	NIC III	NIC III
3	CD54	CD50	0,15	98,72	209,62	NIC III	NIC III
3	CD86	CD80	0,43	336,78	1266,31	NIC III	NIC III
4	NKT	CD30	0,01	649,38	250,29	NIC III	NIC III
4	NKG2D	IFN-gama	0,81	102,96	224,17	NIC III	NIC III
4	NKG2D	IL-10	0,19	136,1	173,82	NIC III	NIC III
4	CD102	CD50	21,93	82,58	344,39	NIC III	NIC III
4	CD54	CD50	2,54	79,41	377,06	NIC III	NIC III
4	CD86	CD80	2,27	78,31	703,55	NIC III	NIC III
5	NKT	CD30	0,02	266,55	1018,15	NIC II	NIC II
5	NKG2D	IFN-gama	0,19	111,62	296,34	NIC II	NIC II
5	NKG2D	IL-10	0,04	181,87	435,18	NIC II	NIC II
5	CD102	CD50	0,27	85,52	182,82	NIC II	NIC II
5	CD54	CD50	0,02	74,32	158,2	NIC II	NIC II
5	CD86	CD80	0,23	93,13	411,48	NIC II	NIC II
6	NKT	CD30	0,24	326,24	138,68	NIC III	NIC III
6	NKG2D	IFN-gama	0,01	65,2	127,49	NIC III	NIC III
6	NKG2D	IL-10	0	65,59	N/A	NIC III	NIC III
6	CD102	CD50	7,79	63,34	170,69	NIC III	NIC III
6	CD54	CD50	2,28	72,25	179,95	NIC III	NIC III
6	CD86	CD80	23,89	60,35	608,47	NIC III	NIC III
7	NKT	CD30	0	160,56	N/A	NIC II	NIC II
7	NKG2D	IFN-gama	1,04	130,45	224,45	NIC II	NIC II
7	NKG2D	IL-10	0,02	302,32	159,63	NIC II	NIC II
7	CD102	CD50	0,27	87,69	211,73	NIC II	NIC II
7	CD54	CD50	0,87	113,64	195,22	NIC II	NIC II
7	CD86	CD80	0,08	115,13	267,35	NIC II	NIC II
8	NKT	CD30	0	226,5	182,69	NIC III	NIC III
8	NKG2D	IFN-gama	0,19	119,59	161,4	NIC III	NIC III
8	NKG2D	IL-10	0,06	259,46	155,85	NIC III	NIC III
8	CD102	CD50	19,82	72,91	216,01	NIC III	NIC III
8	CD54	CD50	6,65	99,99	262,03	NIC III	NIC III
8	CD86	CD80	1,87	51,27	434,47	NIC III	NIC III

