

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL IMUNE CELULAR E
SOLÚVEL DE PACIENTES COM MELANOMA
METASTÁTICO SUBMETIDOS À TERAPIA COM
INIBIDORES DE *CHECKPOINTS* IMUNOLÓGICOS**

IASMIM POLIDO SANTOS

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente para
obtenção de Título de Mestre em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Kenneth John Gollob

Co-orientadora: Dra. Amanda Braga de Figueiredo

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

S237 Santos, Iasmim Polido

Caracterização do perfil imune celular e solúvel de pacientes com melanoma metastático respondedores ou não à imunoterapia com inibidores de *checkpoint* / Iasmim Polido Santos - São Paulo, 2020.

49p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Kenneth John Gollob

Descritores. 1. Melanoma/Melanoma. 2. Quimiocina CXCL9/Chemokine CXCL9.
3. Imunoterapia/Imunotherapy. 4. Estudos Prospectivos/Prospective Studies

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

Este trabalho recebeu apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de bolsa de mestrado (processo número 32361/2019-1).

Dedico esse trabalho à minha família e meu noivo, que tanto me apoiaram. Dedico também a todos os pacientes que possam se beneficiar dos frutos desse estudo. Isso tudo foi por vocês!

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos aos meus pais: sem o incentivo deles e o olhar através do que eu mesma enxergava, jamais chegaria até aqui. Com eles aprendi que conhecimento é o bem mais precioso que um ser humano pode ter, e que a coisa mais bonita é poder compartilhá-lo.

Agradeço enormemente à minha irmã e ao meu noivo, que nunca me permitiram fraquejar, e que sempre estiveram prontos por mim. Das (*tantas*) vezes que me vi desistir ou simplesmente querer adiar o sonho para poder cuidar de coisas que me requeriam muito, eles supriram a minha falta para que eu pudesse seguir.

Não posso deixar de agradecer também à minha família, ao meu avô que sempre teve orgulho incondicional de mim, aos meus sogros que sempre me incentivaram, à minha madrastra que sempre torceu por mim, assim como a Nice, a Amma e a Clara, que nunca saíram do meu lado.

Agradeço ao A.C.Camargo Cancer Center que foi minha casa por 2 anos e meio, com uma estrutura surreal e um apoio incondicional à pesquisa. Isso fez toda a diferença.

Aos meus colegas de grupo Ananda, Guilherme, Dálete e Stephanie, agradeço pelo compartilhamento de jornada. Vocês me ensinaram muito mais do que imaginam. À Nayane, agradeço pela doação de si para mim, para me ensinar a ser uma melhor cientista e uma melhor pessoa. Agradeço à Clara, a quem sempre me incentivou, me ouviu, me aconselhou e me ensinou muito mais do que apenas no âmbito profissional. À Amanda, minha co-orientadora que se transformou em muito mais que um vínculo profissional, e que sempre me ensinou da maneira mais transparente e clara possível, em todo e qualquer momento que eu precisei. À todos vocês, gratidão.

Gostaria de agradecer também ao Tiago, que nunca economizou em esforços para me estimular a crescer e melhorar. À Kátia, que muito me ensinou e me fez refletir sobre a vida. Ao Wallax, Glauco e Gabi, que sempre estiveram dispostos a me ajudar independentemente de qualquer situação. Ao Dr. Vladimir, que em muitos momentos me acolheu e cuidou da minha família também.

Finalizo meu agradecimento ao meu orientador, Dr. Ken, que sempre acreditou em mim, sempre me incentivou e sempre esteve disposto a dividir parte do seu infinito conhecimento comigo. Agradeço também por tudo que fez à minha família, minha gratidão é eterna.

Só posso ser grata pela jornada até aqui, ela com certeza me preparou para a que começa a partir de agora.

RESUMO

Santos IP. **Caracterização do perfil imune celular e solúvel de pacientes com melanoma metastático respondedores ou não à imunoterapia com inibidores de *checkpoint*.** [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

Melanoma é um dos tumores de pele e mucosa mais agressivos e, apesar da sua baixa incidência, tem uma alta letalidade. A implementação da imunoterapia para o seu tratamento foi um importante passo na busca de terapias para esse câncer, com cerca de 30% de resposta. Neste estudo longitudinal prospectivo, foram selecionados 19 pacientes com melanoma metastático ou localmente avançado submetidos à imunoterapia com anti-PD-1, combinado ou não com anti-CTLA-4. Desta forma, a caracterização do perfil imune sistêmico celular - por citometria de fluxo multiparamétrica - e solúvel - pela plataforma Bio-Plex - dos pacientes submetidos à imunoterapia auxiliou na caracterização dos perfis imunológicos dos pacientes respondedores ou não respondedores. Foi possível concluir que o perfil imune dos pacientes respondedores é mais pró-inflamatório, exemplificado por aumentos de linfócitos T CD8, CXCL9 e IFN- γ , por exemplo. A frequência de monócitos não clássicos está aumentada nos pacientes respondedores antes do início do tratamento, porém após o início do tratamento se iguala em pacientes respondedores e não respondedores. Como biomarcador é possível destacar a quimiocina CXCL9, que teve valores aumentados desde antes do início do tratamento, aumentando ainda mais após o início do tratamento em pacientes respondedores, possuindo alta sensibilidade e especificidade como preditor de resposta à imunoterapia.

Descritores: Melanoma. Quimiocina CXCL9. Imunoterapia. Estudos Prospectivos

ABSTRACT

Santos IP. [Characterization of the cellular and soluble immune profile of patients with metastatic melanoma submitted to treatment with immune checkpoint inhibitors]. [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

Melanoma is one of the most aggressive skin and mucosal tumors and, despite its low incidence, it has a high lethality. The implementation of immune checkpoint immunotherapy was an important advance for treatment of melanoma leading to a response rate of approximately 30%. In this prospective longitudinal study, 19 patients were selected with metastatic or locally advanced melanoma who underwent immunotherapy with anti-PD-1 alone, or in combination with anti-CTLA-4. The characterization of the cellular systemic immune profile using multiparametric flow cytometry, and soluble profile using the Bio-Plex platform allowed for the characterization of the immunological profiles of the responder or non-responder patients. This study found that the immune profile of responder patients is more pro-inflammatory, exemplified by increases in CD8⁺ T cells, and the immune mediators CXCL9 and IFN- γ , for example. Moreover, non-classical monocytes in the baseline are increased in responders, but 3 weeks after treatment it is equal in responders and non-responders. As a biomarker it is possible to highlight the chemokine CXCL9, which had increased values since before the start of treatment, increasing even more after the start of treatment in responding patients, having high sensitivity and specificity as a predictor of response to immunotherapy.

Keywords: Melanoma. Chemokine CXCL9. Immunotherapy. Prospective Studies

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquemática dos objetivos e métodos do estudo.....	12
Figura 2	Estratégia de análise utilizada para obtenção de frequência de células CD4+, T CD8+, T DN, T DP	15
Figura 3	Estratégia de análise utilizada para obtenção de frequência de células NKT DN	15
Figura 4	Estratégia de análise utilizada para obtenção de frequência de células CD8 NKT, CD4 NKT	16
Figura 5	Estratégia de análise utilizada para obtenção de frequência de células NK	16
Figura 6	Estratégia de análise utilizada para obtenção de frequência de linfócitos B ...	17
Figura 7	Estratégia de análise utilizada para obtenção de frequência de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos e de células dendríticas.....	17
Figura 8	Esquema de pacientes recrutados incluídos e excluídos do trabalho.....	18
Figura 9	Quantificação de CXCL9 por ensaio multiplex em pacientes com melanoma respondedores e não respondedores ao tratamento em tempo 0.....	20
Figura 10	Porcentagem de linfócitos totais no sangue periférico de pacientes com melanoma respondedores e não respondedores ao tratamento em tempo 0	21
Figura 11	Porcentagem de linfócitos duplo positivos a partir das células CD3+ (linfócitos T) e monócitos não clássicos a partir dos monócitos totais no sangue periférico de pacientes com melanoma respondedores e não respondedores em tempo 0	22

Figura 12	<i>Heatmap</i> para as populações celulares no tempo 0 que tiveram valor de p menor que 0,19 agrupadas de acordo com a resposta ao tratamento, tipo de resposta e estadiamento da doença	23
Figura 13	Matriz de correlação para pacientes respondedores (A) e não respondedores (B) à imunoterapia do tempo 0	24
Figura 14	Quantificação de CXCL9, TNF- α , IL-2R α e IFN- γ por ensaio multiplex em pacientes com melanoma respondedores e não respondedores em tempo 1 ...	25
Figura 15	Quantificação de G-CSF, TRAIL, IL-12(p40) e MCP-3 por ensaio multiplex em pacientes com melanoma respondedores e não respondedores em tempo 1	26
Figura 16	<i>Heatmap</i> das citocinas no tempo 1, separadas por 0 e 1 para valores abaixo e acima da mediana, respectivamente, com parâmetros como: resposta e tipo de resposta, estadiamento da doença, tratamento e tipo de tratamento	27
Figura 17	Porcentagem de monócitos totais no sangue periférico de pacientes com melanoma respondedores e não respondedores em tempo 1	28
Figura 18	Porcentagem de CD3+, linfócitos T CD8+, duplo negativos (DN), células NK e linfócitos B no sangue periférico de pacientes respondedores e não respondedores em tempo 1	29
Figura 19	<i>Heatmap</i> das populações celulares que tiveram valor de p menor que 0,19 com diversos parâmetros para clusterização.....	30
Figura 20	Matriz de correlação para pacientes respondedores (A) ou não respondedores (B) à imunoterapia em tempo 1	31
Figura 21	Comparação dos valores de CXCL9 em T0 e T1 em pacientes respondedores e não respondedores (n = 12) ao tratamento (n = 4).....	32

Figura 22	Quantificação de CXCL9, IL-2R α , IFN- γ , TRAIL, G-CSF, IL-12 (p40), IL-6 e MIP-1 α em pacientes respondedores e não respondedores em <i>fold change</i>	33
Figura 23	<i>Heatmap</i> das citocinas em fold change, separadas por 0 e 1 para valores abaixo e acima da mediana, respectivamente, com parâmetros como: resposta e tipo de resposta, estadiamento da doença, tratamento e tipo de tratamento .	34
Figura 24	Porcentagem de monócitos totais e não clássicos, e de NKT CD4+ sangue periférico de pacientes com melanoma respondedores e não respondedores em <i>fold change</i>	35
Figura 25	Curva ROC de CXCL9.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estadiamento pelo critério TNM para melanoma cutâneo.....	3
Tabela 2	Estadiamento pelo critério anatômico para melanoma cutâneo	4
Tabela 3	Tabela de contingência.....	19
Tabela 4	Informações estatísticas da curva ROC (área embaixo da curva e valor de p) e valores estatísticos da regressão logística (valor de p, odds ratio (OR), e intervalo de confiança (IC) de 95%)	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos
BD	Becton Dickinson (empresa)
BRAF	Gene humano que produz uma proteína chamada B-Raf
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CTACK	<i>Cutaneous T-cell-attracting chemokine</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4</i>
DN	Duplo negativo
DP	Duplo positivo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GRO	<i>Growth-regulated oncogene</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigen – DR isotype</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	Intervalo de confiança
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IP	<i>Interferon gamma-inducible protein</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCA	Metilcolantreno
MCAF	<i>Monocyte chemotactic and activating factor</i>
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MICA/B	<i>MHC class I chain-related protein A and B</i>
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>

MIG	<i>Monokine induced by gamma interferon</i>
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Proteins</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NK	<i>Células natural killer</i>
NKT	<i>Natural killer T cell</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RNA	<i>Ácido ribonucleico</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SCGF	<i>Stem Cell Growth Factor</i>
SDF	<i>Stromal cell-derived factor</i>
TCR	<i>Receptor de células T</i>
TGF	<i>Fator de crescimento e transformação</i>
TNF	<i>Fator de necrose tumoral</i>
TNM	<i>Tamanho, número e metástase</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
UV	<i>Ultravioleta</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	JUSTIFICATIVA	9
3	OBJETIVOS	10
3.1	Objetivo Geral	10
3.2	Objetivos Específicos	10
4	MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1	Recrutamento de pacientes	11
4.2	Coleta de sangue	11
4.3	Avaliação do perfil imune celular por citometria de fluxo multiparamétrica	12
4.4	Avaliação do perfil imune solúvel.....	13
4.5	Análise estatística	13
4.6	Classificação de resposta	14
4.7	Estratégias de análise	14
5	RESULTADOS	18
5.1	Recrutamento e análise geral dos pacientes.....	18
5.2	Caracterização do perfil imune celular e solúvel no <i>baseline</i> (T0)	19
5.3	Caracterização do perfil imune celular e solúvel após início do tratamento (3 semanas)	24
5.4	Caracterização do perfil imune celular e solúvel de acordo com o tempo	32
5.5	Identificação de um possível biomarcador	35
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÃO.....	44
8	REFERÊNCIAS.....	45

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

APÊNDICE

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças onde, como característica comum, algumas células perdem o controle de proliferação formando os chamados tumores, que podem se instalar nos tecidos adjacentes – e essa capacidade de se instalar nos tecidos que confere a malignidade. Além da invasão aos tecidos adjacentes, as células tumorais podem migrar para tecidos distantes através da circulação sanguínea ou linfática, e esse desenvolvimento em local distante do tumor primário é o que caracteriza metástase ¹.

Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), o número estimado de novos casos em 2018 (em todo mundo, ambos os sexos, todas as idades) é de 18.078.957, com estimativa de 9.555.027 mortes ², sendo a segunda principal causa de morte no mundo ³. No Brasil, o número estimado de todas as neoplasias malignas corrigidas para o sub-registro é de pouco mais de 634 mil casos, chamando atenção para o câncer de próstata e de mama devido à maior incidência em homens e mulheres, respectivamente, e o melanoma pela alta letalidade apesar da baixa incidência ⁴.

Melanoma é um tipo de câncer que tem origem nos melanócitos, que são as células responsáveis pela produção do pigmento que tem capacidade de gerar fotoproteção contra os raios ultravioletas (UV) – a melanina ^{5,6}. Até o desenvolvimento do melanoma metastático existem lesões precursoras, que partem de *naevus*, passando por *naevus* displásica, melanoma *in situ*, chegando em melanoma invasivo e metastático. Esse desenvolvimento não é necessariamente linear e ordinal, e o principal fator de risco associado é a exposição crônica aos raios UV ⁵.

Naevus, uma proliferação dos melanócitos numa área de aproximadamente 2 mm de diâmetro, pode ser congênita – presente desde o nascimento, ou adquirida durante a vida. A presença de mutação em BRAF em *naevus* (gene que codifica uma serina/treonina quinase, responsável pela ativação da via de MAPK, que leva à proliferação dos melanócitos ⁷) é um fator importante associado à inicialização da neoplasia melanocítica, embora já visto que ela sozinha não é suficiente para o desenvolvimento do melanoma ⁸.

Naevus displásica é um estágio controverso por ser uma categoria entre *naevus* e o melanoma. Seu diagnóstico clínico caracteriza-se pelo tamanho – tendo 5 mm ou mais de diâmetro, pela pigmentação variada, assimetria e bordas indefinidas. A presença de apenas uma *naevus* displásica está associada ao dobro de chance de desenvolvimento de melanoma,

enquanto a presença de dez ou mais, está associado a uma chance 12 vezes maior. Desta forma, o diagnóstico clínico de *naevus* displásica é importante para o reconhecimento de um indivíduo em grupo de risco, e a indicação correta para prevenção ⁹.

Melanoma *in situ*, segundo definição do *American Joint Committee on Cancer* é definido como o melanoma limitado à epiderme ¹⁰. A exposição crônica aos raios UV levam a uma assinatura mutacional que pode implicar em uma mutagênese dos melanócitos das *naevus* até melanoma metastático, passando pelo melanoma *in situ* como intermediário. Como tratamento, existem diferentes tipos de cirurgia de ressecção e estudos analisam o tratamento tópico com Imiquimod, que leva a uma resposta imune localizada ^{11,12}.

A partir do momento que o melanoma sai do epitélio epidermal e invade os tecidos subjacentes, ele é considerado melanoma invasivo. Considera-se como melanoma metastático apenas quando ocorre disseminação para outros tecidos distantes. Para tal, o tumor tem a capacidade de neovascularização, invasão através da parede vascular, entrada em circulação sanguínea e/ou linfática, capacidade de crescimento e proliferação em microambiente secundário ¹³. Melanoma metastático é o terceiro câncer que mais leva à metástase cerebral, com cerca de 75% dos pacientes metastatizando para o cérebro, ficando atrás apenas de câncer de pulmão e mama. Metástases cerebrais levam à morte em aproximadamente 95% dos casos ¹⁴.

Em relação ao estadiamento, é possível fazer classificação de TNM (onde T se relaciona ao tamanho do tumor, N ao número de linfonodos acometidos, e M sítio de metástase), como exemplificado na Tabela 1, ou por estadiamento anatômico, indo de I à IV, tendo como critérios de divisão a classificação TNM (Tabela 2)¹⁵.

Tabela 1 - Estadiamento pelo critério TNM para melanoma cutâneo.

Classificação		
T	Espessura (mm)	Status de ulceração/Mitose
Tis	NA	NA
T1	≤ 1.00	a: Sem ulceração e mitose < 1/mm ² b: Com ulceração ou mitose ≥ 1/mm ²
T2	1.01-2.00	a: Sem ulceração b: Com ulceração
T3	2.01-4.00	a: Sem ulceração b: Com ulceração
T4	> 4.00	a: Sem ulceração b: Com ulceração
N	Nº de pontos metastáticos	Carga metastática nodal
N0	0	NA
N1	1	a: Micrometástase b: Micrometástase
N2	2 a 3	a: Micrometástase b: Micrometástase c: Metástase em trânsito/satélites sem pontos metastáticos
N3	4+	
M	Sítio	Lactato desidrogenase sérico
M0	Sem metástases distantes	NA
M1a	Pele distante, subcutâneo ou metástase nodal	Normal
M1b	Metástase de pulmão	Normal
M1c	Metástase em outros órgãos	Normal
	Qualquer metástase distante	Elevado

Fonte: Adaptado de Balch et al.¹⁵

Tabela 2 - Estadiamento pelo critério anatômico para melanoma cutâneo

Estadiamento clínico				Estadiamento patológico			
	T	N	M		T	N	M
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0		T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
III	Qualquer T	N > N0	M0	IIIA	T1-4a	N1a	M0
					T1-4a	N2a	M0
				IIIB	T1-4b	N1a	M0
					T1-4b	N2a	M0
					T1-4a	N1b	M0
					T1-4a	N2b	M0
					T1-4a	N2c	M0
				IIIC	T1-4b	N1b	M0
					T1-4b	N2b	M0
					T1-4b	N2c	M0
					Qualquer T	N3	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Adaptado de Balch et al.¹⁵

Como dito anteriormente, para tratamento de melanoma existem diversas opções, como cirurgia de ressecção, tratamentos tópicos e quimioterapias. Porém, o único tipo de quimioterápico aprovado pelo *United States Food and Drug Administration* (FDA) disponível para o tratamento de melanoma metastático de 1976 até 1998 foi a Dacarbazina⁶. Sua eficácia é limitada, com aproximadamente 10% de resposta¹⁶. Em 1988, o FDA aprovou o uso de altas doses de interleucina 2 (IL-2) como tratamento, que tem aproximadamente 16% de resposta, porém, tem alta toxicidade, podendo levar a óbito (cerca de 2% dos pacientes)¹⁷.

Com o uso da IL-2 retomando a ideia de imunoterapia, sua eficácia perante o tratamento anterior somado à limitação em relação à toxicidade, foi necessário um olhar mais cuidadoso

em relação aos mecanismos imunes relacionados ao melanoma, pois este é considerado um dos tumores mais imunogênicos devido à alta taxa de mutações por UV, levando à formação de neoantígenos, que são reconhecidos como “não-próprios” pelo sistema imune ¹⁸.

Apesar da aprovação de um imunoterápico como a IL-2 apenas em 1998, o estudo da relação entre o sistema imune e as células tumorais são anteriores a isso. Em 1909, Paul Ehrlich, ganhador do prêmio Nobel de 1908, propôs que devido às alterações de expressão proteicas das células tumorais (mais tarde entendido como sendo por conta das mutações), elas se diferem das células do sítio de origem, e essa diferença é reconhecida pelo sistema imune, que uma vez ativado destrói essas células. Esse processo é chamado de eliminação ou imunovigilância ¹⁹, que faz parte da dinâmica chamada de imunoedição.

Para melhor compreender essa resposta imune às células tumorais, foram testados camundongos com níveis normais de interferon gama (IFN- γ) e camundongos deficientes em IFN- γ , ou com perforina em níveis normais e deficientes em perforina. IFN- γ é a citocina produzida por linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) em resposta a patógenos intracelulares, estimulando especialmente macrófagos e células dendríticas ²⁰. Perforina é uma proteína que auxilia na citotoxicidade dos linfócitos T CD8+ e células natural killers (NK) pela perfuração da membrana da célula alvo ²¹. Em ambos os cenários com deficiência, houve maior propensão ao desenvolvimento de tumores, que cresceram em maior quantidade, tamanho e em menor tempo ²², indicando uma perda do controle tumoral pelo sistema imune.

O mesmo racional foi aplicado para a avaliação do papel das células imunes no controle tumoral, assim como IFN- γ e perforina. O bloqueio de células como NK, NKT, linfócitos T ou linfócitos B, também levam à uma disseminação e crescimento tumoral aumentados, o que leva à conclusão de que elas também fazem parte do controle tumoral ²³. Em conclusão, entendendo que o sistema imune tem a capacidade de fazer o controle tumoral, e a imunovigilância é o estado onde o sistema imune consegue identificar células tumorais devido aos neoantígenos provenientes das mutações, se ativar e combatê-las. No melanoma, pela alta carga mutacional, essa ativação é aumentada e por isso o melanoma é considerado um tumor altamente imunogênico ¹⁸.

O passo seguinte na imunoedição é o equilíbrio, que é o momento seguinte à imunovigilância, em que algumas células tumorais não foram reconhecidas e eliminadas. Nessa fase, o sistema imune tem capacidade apenas de evitar o crescimento tumoral, mas não de eliminar as células tumorais, que ficam em estado de dormência. A ideia da fase de equilíbrio foi usada para explicar o longo período entre o evento inicial de transformação até a fase de escape e desenvolvimento da doença e, por isso, é a fase mais longa da imunoedição ²³.

O primeiro experimento feito para comprovar a fase de equilíbrio foi em 2007, com o uso de um carcinógeno químico chamado MCA, em baixas doses, em camundongos *naïve* selvagens. Apenas uma parte dos camundongos desenvolveram tumores e, desta forma, os camundongos que não desenvolveram foram selecionados e induzidos à imunodeficiência através da depleção de células T CD4+, células T CD8+ e/ou neutralização de IFN- γ . Destes, 50% rapidamente desenvolveram tumores proximais ao local da injeção. Quando houve o bloqueio de células NK (por depleção, bloqueio de reconhecimento ou inibição da função efetora) não houve o mesmo comportamento. Em suma, pôde-se concluir que a imunidade adaptativa, e não a inata (ao menos simbolizada por células NK), que é responsável pelo controle do crescimento tumoral na fase de equilíbrio ²⁴.

Em melanoma, a exemplificação da fase de equilíbrio se dá pelos casos onde houve morte de pacientes com melanoma metastático por razões diferentes ao câncer, e a subsequente doação dos órgãos. Os pacientes que receberam os transplantes também desenvolveram melanoma metastático, e isso pode ser explicado pela fase de equilíbrio dos doadores: já existiam células tumorais nos órgãos doados, porém estavam em fase de equilíbrio. Para os pacientes transplantados, que são necessariamente imunossuprimidos, houve o rompimento dessa fase, levando ao desenvolvimento tumoral ^{25,26,27}.

A manutenção da resposta imune ocorre devido a um balanço em relação à resposta das células imunes ao tumor. As células tumorais expressam neoantígenos que são reconhecidos por T CD8+ efetor no contexto do MHC de classe I, ou células NK por ligantes NKG2D. As células dendríticas também têm capacidade de reconhecer e apresentar os antígenos tumorais tanto para os linfócitos T quanto para as células NKT (via CD1d). As células efetoras uma vez ativadas produzem perforina, granzima e IFN- γ , que tem ação de inibir a proliferação tumoral e a angiogênese em uma resposta anti-tumoral. A resposta imune inato também tem contribuição para a imunidade anti-tumoral, com a presença dos macrófagos M1, células NK e granulócitos produtores de TNF- α , IL-1, IL-12 e espécies reativas de oxigênio ²⁸.

O controle da resposta anti-tumoral ocorre para manter a homeostase e não haver uma resposta inflamatória exacerbada. Esse controle acontece pelas células T CD4+ diferenciadas em T reguladoras (Treg), onde produzem preferencialmente IL-10 e fator de crescimento e transformação β (TGF- β), que agem de forma a suprimir a resposta pró-inflamatória. Os macrófagos M2 tem uma maior atividade anti-inflamatória e pró-tumoral por aumentar a proliferação celular, o recrutamento de Treg e fatores angiogênicos, e o aumento e predomínio desses fatores anti-inflamatórios auxiliam no rompimento da fase de equilíbrio ²⁹.

Quando a fase de equilíbrio é rompida, as células tumorais adquirem capacidade de escapar do sistema imune e de se desenvolver levando ao surgimento do câncer clinicamente detectável, que é a fase chamada de escape. As células tumorais passam por modificações genéticas e por pressão do sistema imune e ocorre uma seleção das células com maior capacidade de persistência no microambiente tumoral ²³.

Diferentes mecanismos podem levar ao escape, como por exemplo: anergia (diminuição de quantidade e ativação de TCR), diminuição do reconhecimento imune (perda da molécula do *major of histocompatibility complex* (MHC) de classe I ou de moléculas co-estimuladoras), desenvolvimento de um microambiente imunossupressor (aumento de citocinas como IL-10 e TGF- β) ou estado de exaustão imune (expressão de moléculas como *programmed death 1* (PD-1) e seu ligante PD-L1 ou de *proteína 4 associada ao linfócito* (CTLA-4), por exemplo ³⁰).

A função fisiológica do CTLA-4 é de se ligar às moléculas co-estimuladoras B7-1 (CD80) ou B7-2 (CD86), e por ter maior avidéz de ligação que o CD28, essa ligação é privilegiada quando o CTLA-4 está expresso na célula. Constitutivamente, o CD28, presente na superfície dos linfócitos T, precisa se ligar aos ligantes B7-1 ou B7-2 para o envio de sinais co-estimuladores quando ocorre a ligação de MHC com o receptor de célula T (TCR), levando à expansão clonal. O CTLA-4, por competição, se liga aos receptores co-estimuladores, e por consequência inibe o sinal de proliferação, de modo a manter a homeostase e evitar resposta imune exacerbada ³¹.

O PD-1, também da superfamília do CD28, é um importante receptor inibidor presente especialmente nos linfócitos T, mas também é encontrado em células NK, linfócitos B, monócitos e células dendríticas. Como ligantes, até o momento, existem dois descritos: PD-L1 e PD-L2, que estão presentes tanto em células imunes como em outros tipos celulares, por exemplo os próprios tumores. PD-L1 é mais expresso por células hematopoiéticas, como células T e B, células dendríticas, macrófagos, células mesenquimais, entre outras. Também é expresso em células não hematopoiéticas, como por exemplo, células do pulmão, endotélio vascular, ilhas pancreáticas. Já o PD-L2 tem expressão mais restrita, estando expresso em células dendríticas ativadas, macrófagos, célula B e mastócitos ^{32,33}.

Após o reconhecimento de antígenos e ativação das células T, elas expressam o PD-1 na superfície, que quando se ligam aos respectivos ligantes, são responsáveis pela sinalização de atenuação da atividade das células T ativadas. Essa expressão dos ligantes do PD-1 em diferentes tecidos do corpo demonstram a sua importância na imunorregulação sistêmica. A ligação entre PD-1 e seus ligantes tem como função a prevenção da superestimulação do sistema imune, e mantém a tolerância contra auto antígenos. No contexto tumoral, a expressão

exacerbada de PD-L1 pelas células tumorais faz com que a ação antitumoral principalmente das células citotóxicas seja bloqueada, e assim, o tumor tem a capacidade de crescer com o sistema imune inibido ³⁴.

Baseados nesses estudos, foram feitos ensaios *in vitro* e *in vivo* sobre a ação em tumores do bloqueio de CTLA-4, de PD-1 e de PD-L1 e foi visto um aumento da resposta anti-tumoral após o bloqueio. Em todos os casos, o modelo estudado foi de melanoma devido à imunogenicidade e, apesar de apresentarem contratempos como eventos adversos, demonstraram-se importantes candidatos a estudos clínicos ^{35,36}.

Os estudos clínicos feitos em melanoma demonstraram o mesmo resultado: o bloqueio dos receptores ou ligantes consegue tanto controlar o crescimento tumoral, quanto aumentar o tempo de sobrevida livre de doença. Um estudo de fase III, com 834 pacientes de 13 diferentes países, com Ipilimumab – anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, demonstrou capacidade de aumentar a sobrevida global de pacientes metastáticos ou localmente avançados já tratados anteriormente ³⁷.

Para demonstrar a eficácia do Pembrolizumab – anticorpo monoclonal anti-PD-1, um estudo clínico de fase II, com 540 pacientes, de 12 países diferentes, foi feito a fim de comparar a eficácia desse anticorpo com a quimioterapia em pacientes refratários ao Ipilimumab. Foi visto que o Pembrolizumab teve capacidade de dobrar a sobrevida livre de doença dos pacientes refratários quando comparados com quimioterapia ³⁸.

Em relação ao Nivolumab – também bloqueador de PD-1, um estudo de fase III, com 418 pacientes de 80 diferentes centros, demonstrou resposta objetiva de 40% nos pacientes tratados com o imunoterápico *versus* 13% de resposta dos pacientes tratados com Dacarbaniza ³⁹.

Apesar dos benefícios clínicos observados em relação aos tratamentos anteriores, a porcentagem de resposta ainda gira em torno de 30 a 40%, com a ocorrência de eventos adversos, que podem levar desde a interrupção do tratamento até o óbito. O entendimento dos mecanismos de falha ao tratamento e a proposta de biomarcadores preditores de resposta são indispensáveis para a melhor elegibilidade dos pacientes para o uso da imunoterapia, sendo a tentativa de elucidação desses pontos o grande foco deste trabalho.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da imunoterapia já ser uma terapia de escolha na clínica, a porcentagem de pacientes refratários ao tratamento ainda é grande - apenas cerca de 30% de resposta em melanoma maligno. Por isso, nosso estudo visa estabelecer padrões celulares e moleculares de pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento, a fim de poder prever se o tratamento com inibidores de *checkpoint* inibitórios pode ser indicado, ou ainda se é possível propor algum tipo de terapia adjuvante.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar comparativamente os perfis imunológicos entre os grupos de respondedores e de não respondedores de pacientes com melanoma metastático submetidos à terapia com inibidores de checkpoints imunológicos, a fim de identificar células, vias e moléculas que possam prever resposta ao tratamento, assim como possíveis marcadores e alvos para o desenvolvimento de terapias adjuvantes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização do perfil imune celular de pacientes respondedores e não respondedores, no sangue periférico antes e após o tratamento (3 semanas);
- Caracterização do perfil imune solúvel de pacientes respondedores e não respondedores, no plasma, antes e após o tratamento (3 semanas);
- Comparar os perfis imunológicos celulares e solúveis para busca de biomarcadores que possam prever resposta ao tratamento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 RECRUTAMENTO DE PACIENTES

Trata-se de um estudo clínico prospectivo e não intervencionista. A atribuição de pacientes a uma estratégia terapêutica específica (anti-PD-1 ou anti-PD-1 com anti-CTLA-4) foi determinada pela adesão ao padrão de prática clínica atualmente aprovado no hospital. O diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos pacientes foram realizados independentemente da decisão de incluir o paciente neste estudo. Todos os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (Apêndice 1) para sua inclusão neste projeto, de acordo com a declaração de Helsink e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob protocolo nº 2463/17C (Anexo 1).

Foram recrutados pacientes com idade superior a 18 anos, de ambos os sexos, diagnosticados com melanoma localmente avançado ou metastático (estágios III ou IV, respectivamente), e que seriam tratados com Pembrolizumab, Nivolumab ou associações com Ipilimumab independentemente do status de PD-L1, e posteriormente acompanhados. A partir de 12 semanas, os pacientes foram divididos entre respondedores (resposta parcial, resposta completa ou doença estável) e não respondedores ao tratamento, de acordo com critérios clínicos de avaliação de resposta.

4.2 COLETA DE SANGUE

O sangue periférico foi coletado em dois tubos EDTA de 4 mL cada, no momento do diagnóstico (tempo zero) e em visita de acompanhamento padrão para administração de terapia após 3 semanas de início do tratamento. A data da coleta no tempo seguinte ao início do tratamento foi escolhida de modo a coincidir com as visitas dos pacientes para a infusão da imunoterapia (os ciclos são normalmente intervalados de 3 em 3 semanas). No tempo pós início de tratamento, as coletas foram feitas imediatamente antes da infusão, a fim de analisar o perfil imunológico desde a última dose da medicação. As amostras de sangue foram aliquotadas para avaliação das células em sangue fresco por citometria de fluxo multiparamétrica, e o restante centrifugado para retirada do plasma para estudo de citocinas solúveis utilizando a plataforma Bio-Plex (Figura 1).

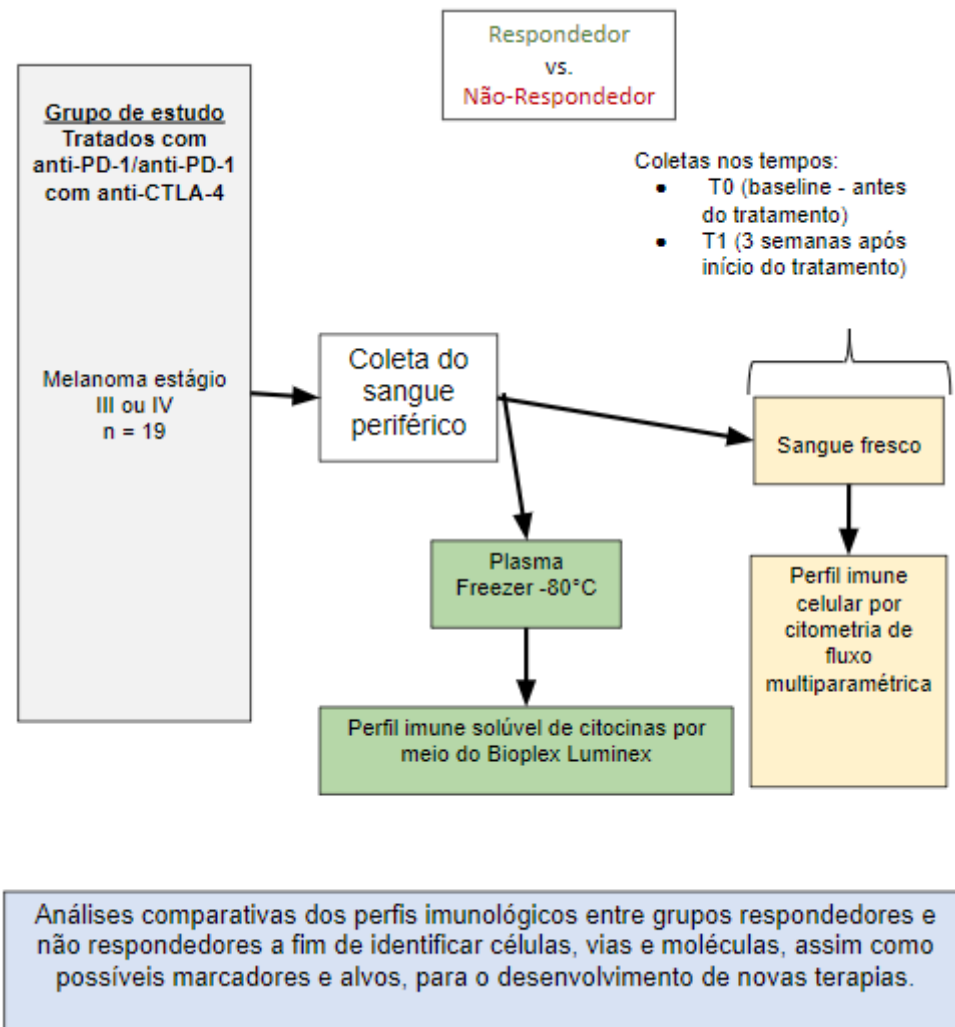


Figura 1 - Esquemática dos objetivos e métodos do estudo

4.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA

O perfil de células imunes foi caracterizado por citometria de fluxo multiparamétrica (FACSymphony A5, BD Bioscience) nas amostras de sangue fresco total. Foram avaliados os linfócitos T (CD4+, CD8+, duplo negativos e duplo positivos) células NK e NKT, linfócitos B, monócitos e células dendríticas. Nesse contexto, foram utilizados os seguintes anticorpos para avaliação:

CD3 - marcador de linfócito T

CD4 - marcador de linfócito T auxiliar

CD56 - marcador de células NK

CD8 - marcador de linfócito T citotóxico

CD16 e CD14 - marcadores de monócitos que indicam as subpopulações de acordo com a expressão de cada marcador

CD19 - marcador de linfócito B

HLA-DR - molécula apresentadora de antígeno

CD11c - marcador de células dendríticas

Os painéis foram testados antes do estudo para gerar matrizes de compensação e configurações do instrumento a serem utilizadas para cada amostra. Pelo menos 50.000 eventos por amostra foram adquiridos. Estudos-piloto foram realizados com todos os painéis de anticorpos utilizando amostras controles para padronizar e titular todos os anticorpos antes de serem utilizados no estudo. Os dados foram analisados com o auxílio do *software* FlowJo (FlowJo LLC).

4.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNE SOLÚVEL

Foram avaliadas 48 substâncias presentes no plasma dos pacientes, cobrindo atividades inflamatórias, anti-inflamatórias e fatores de crescimento e angiogênicos. Foi utilizado o kit Multiplex de citocinas e quimiocinas humanas, Bio-Plex Pro Human Cytokine 48-Plex Panel (BioRad), na plataforma Bio-Plex. O kit permitiu detectar FGF basic, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-1 α , IL-2R α , IL-3, IL-12 (p40), IL-16, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, GRO- α , HGF, IFN- α 2, LIF, MCP-3, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10, MCP-1 (MCAF), CXCL9, β -NGF, SCF, SCGF- β , SDF-1 α , MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , VEGF, CTACK, MIF, TRAIL, IL-18, M-CSF, TNF- β .

Para esta análise, as amostras de plasma foram ressuspendidas com uma mistura de beads, específicas para cada um dos analitos. Cada bead possui uma intensidade exata de cor (vermelho e infravermelho) que é mensurada por um primeiro laser na máquina. O analito ligado é então detectado utilizando um anticorpo de detecção conjugado com um marcador fluorescente, identificado pelo segundo laser. A quantidade de cada analito em pg/mL é calculada com base em uma curva padrão ⁴⁰.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* GraphPad Prism e R Studio. As amostras foram submetidas a testes de normalidade para escolha do teste estatístico ideal. Diferenças entre grupos de respondedores e não-respondedores ao tratamento, e entre os diferentes tempos, com valores de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas, e com valores de $p < 0,19$ indicados com diferenças de interesse. Os testes foram feitos no *software* GraphPad Prism, de acordo com os critérios: se havia distribuição normal, foi feito teste t; se não havia distribuição normal, teste Mann-Whitney. Para as curvas ROC, foi feito regressão logística univariada, também pelo GraphPad Prism. A matriz de correlação foi feita pelo R Studio, considerando que eram dados não paramétricos e, por isso, aplicado o teste de Spearman.

4.6 CLASSIFICAÇÃO DE RESPOSTA

Para a avaliação de resposta foram considerados critérios clínicos, sendo toda a avaliação revisada pelo oncologista Dr. Milton Silva. Os pacientes foram divididos entre respondedores e não respondedores. No grupo de pacientes respondedores foram incluídos: doença estável (aumento de até 29% ou diminuição de até 30% da lesão), resposta parcial (diminuição de mais de 30% da lesão) e resposta completa. No grupo de pacientes não respondedores foram incluídos aqueles que apresentaram progressão de doença (nova lesão ou aumento de 30%).

4.7 ESTRATÉGIA DE ANÁLISES

As avaliações das populações celulares foram feitas com o auxílio do *software* FlowJo, de acordo com as estratégias de análise mostradas abaixo. Foram avaliadas as seguintes populações: linfócitos T CD4+ (CD3+CD56-CD4+CD8-), linfócitos T CD8+ (CD3+CD56-CD8+CD4-), linfócitos T duplo positivos (DP) (CD3+CD56-CD4+CD8+) e T duplo negativos (DN) (CD3+CD56-CD4-CD8-) (Figura 2), células NKT duplo-negativas (CD3+CD56+CD4-CD8-) (Figura 3), células CD8 NKT (CD3+CD56+CD8+), células CD4 NKT (CD3+CD56+CD4+) (Figura 4), e células NK (CD56+CD3-) (Figura 5). Foram analisados também linfócitos B (CD19+HLA-DR+) (Figura 6), monócitos clássicos (CD14+CD16-), não

clássicos (CD16+CD14-) e intermediários (CD16+CD14+), e células dendríticas (CD14-CD16-CD11c+) (Figura 7).

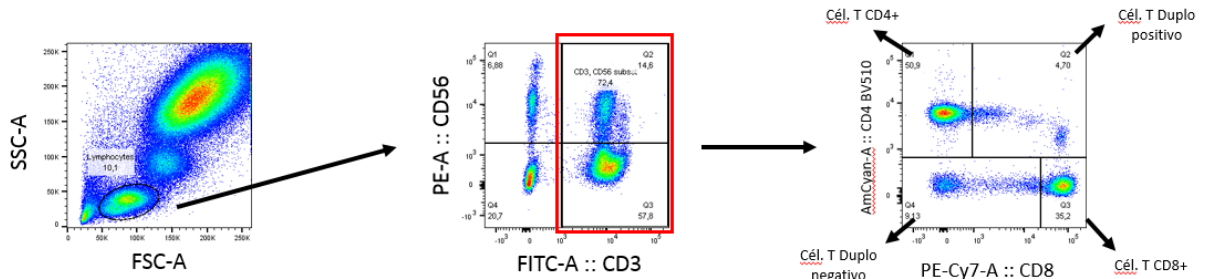


Figura 2 - Estratégia de análise utilizada para obtenção de frequência de células CD4+, T CD8+, T DN, T DP.

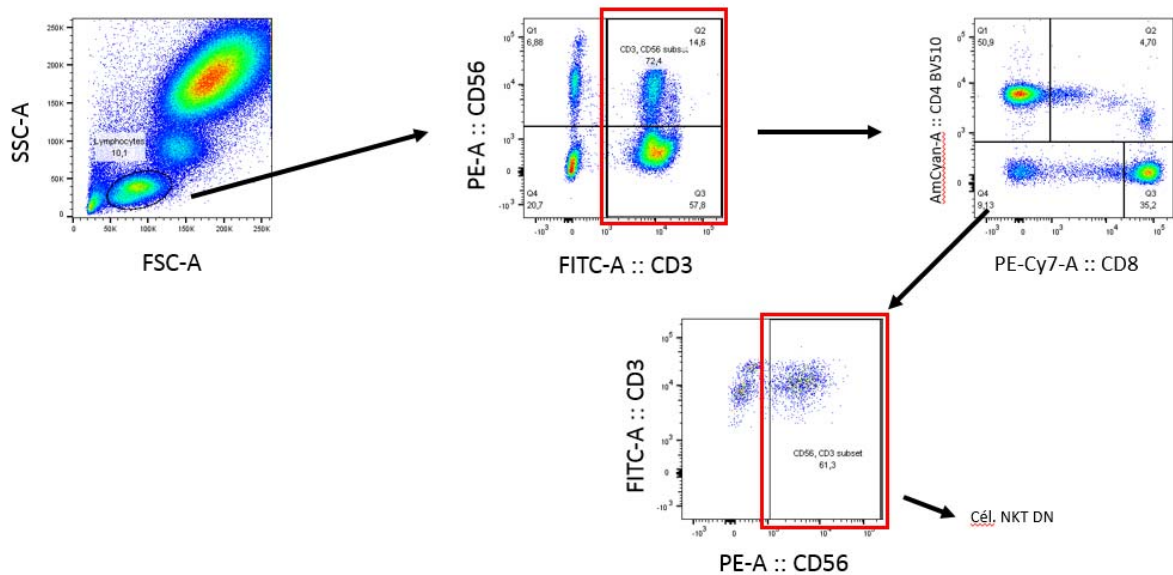


Figura 3 - Estratégia de análise utilizada para obtenção de frequência de células NKT DN.

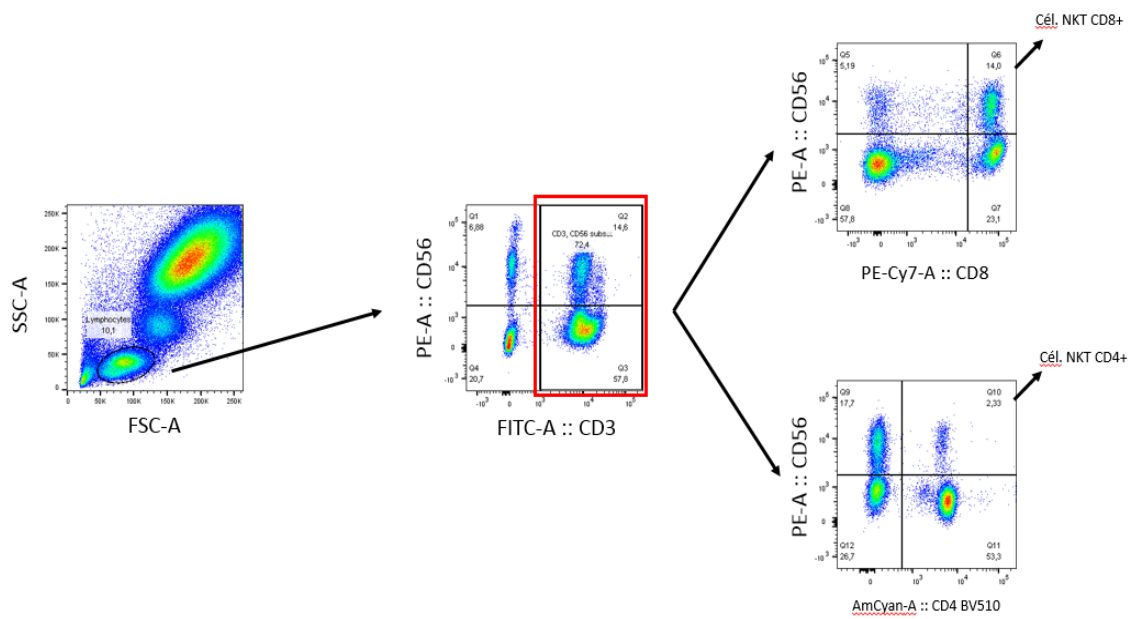


Figura 4 - Estratégia de análise utilizada para obtenção de frequência de células CD8 NKT, CD4 NKT.

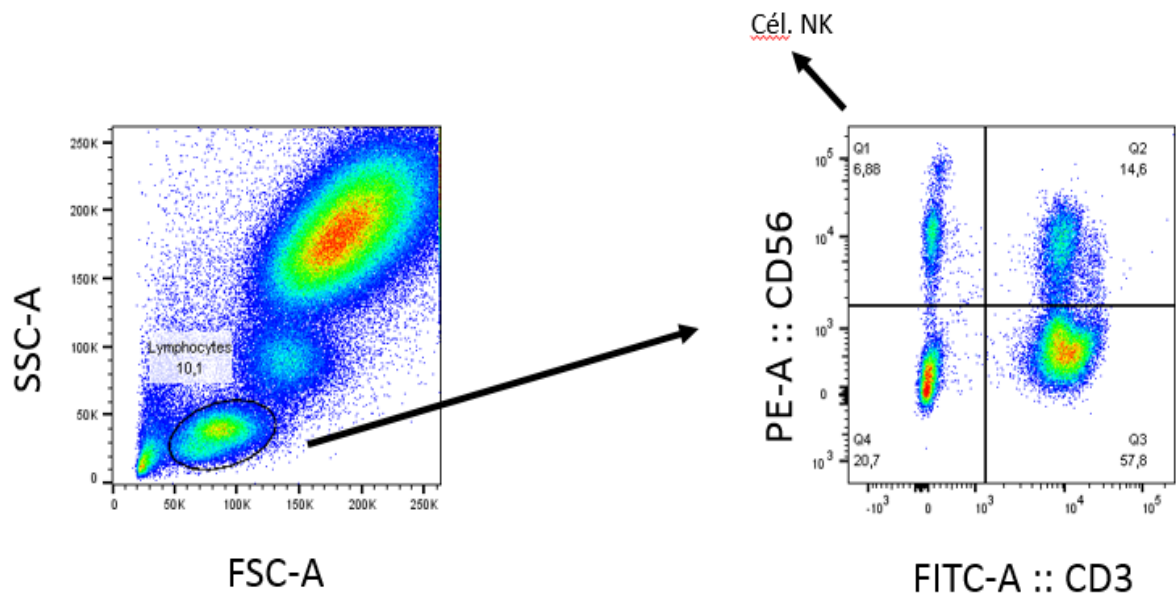


Figura 5 - Estratégia de análise utilizada para obtenção de frequência de células NK.

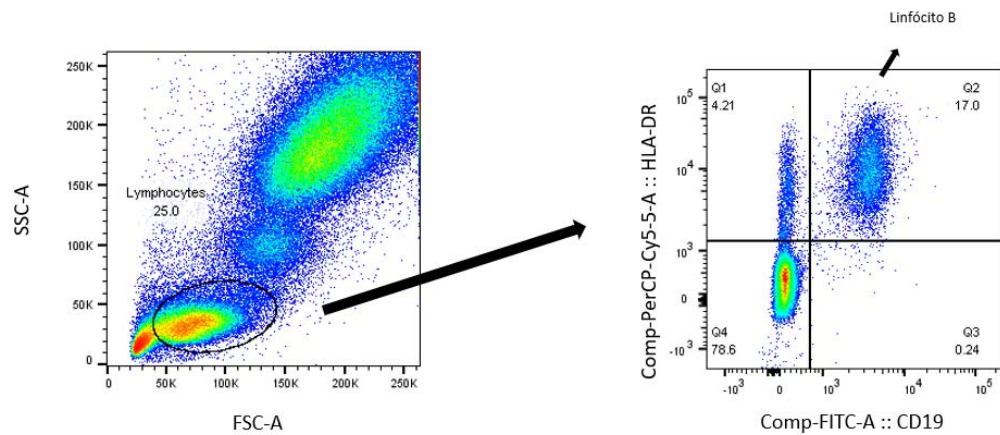


Figura 6 - Estratégia de análise utilizada para obtenção de frequência de linfócitos B.

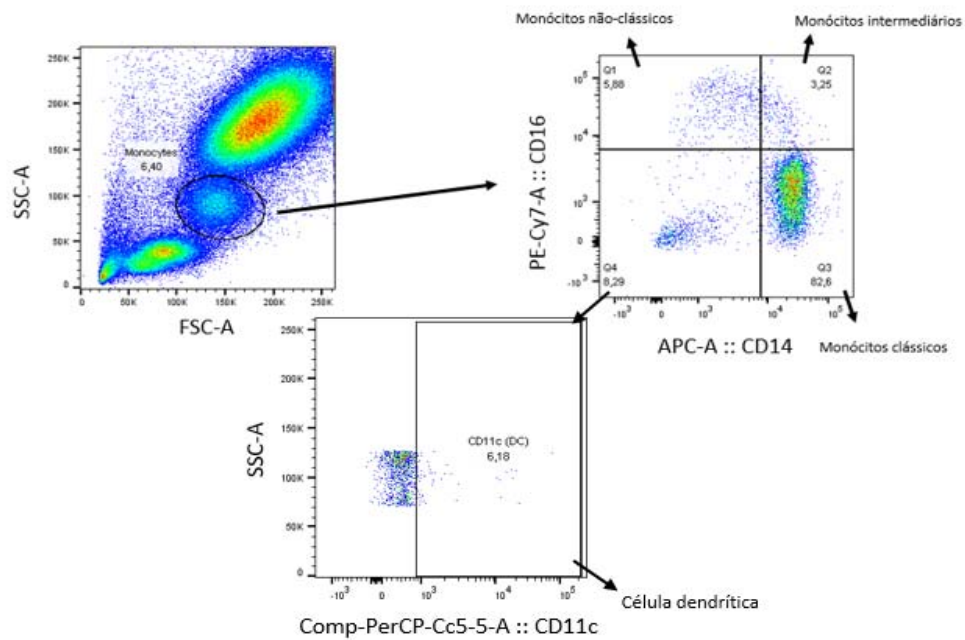


Figura 7 - Estratégia de análise utilizada para obtenção de frequência de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos e de células dendríticas.

5 RESULTADOS

5.1 RECRUTAMENTO E ANÁLISE GERAL DOS PACIENTES

Foram recrutados 46 pacientes. Destes, 22 não entraram no estudo (3 não fizeram imunoterapia, 2 apresentavam linfoma, 1 apresentava sarcoma, 1 veio a óbito, 1 foi submetido à quimioterapia e 14 fizeram tratamento adjuvante, isto é, imunoterapia feita após cirurgia para retirada do tumor). Dos 24 pacientes restantes, 5 ainda não tinham avaliação de resposta clínica, ficando 19 para análise, os quais se dividiram em 15 respondedores (14 tratados com terapia combinada de anti-PD-1 com anti-CTLA-4, e 1 como monoterapia de anti-PD-1) e 4 não respondedores (3 tratados com monoterapia, e 1 com terapia combinada) (Figura 8).

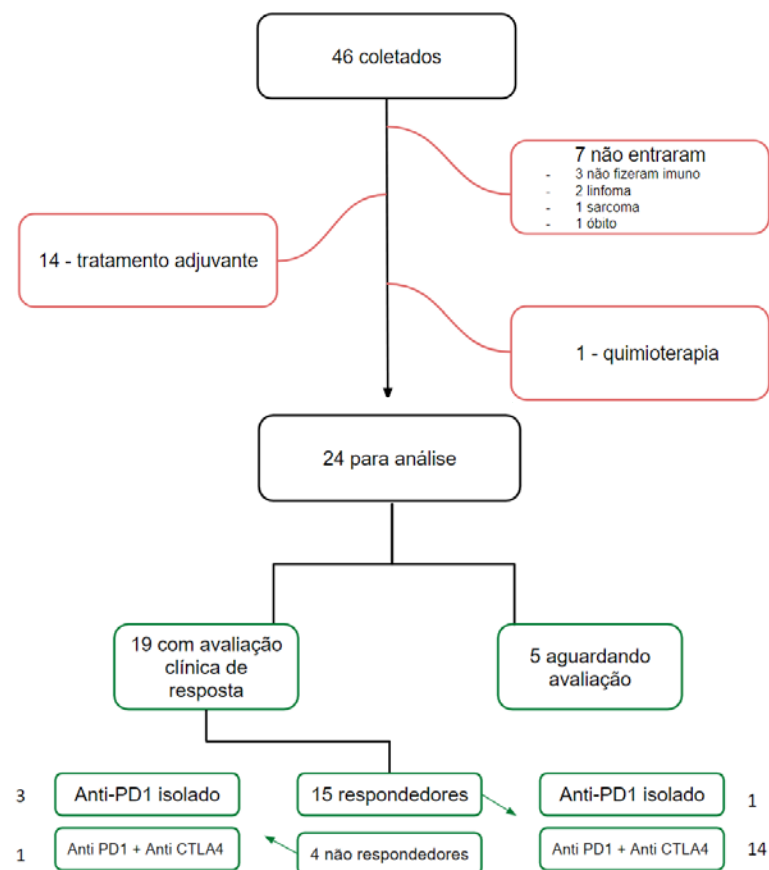


Figura 8 - Esquema de pacientes recrutados incluídos e excluídos do trabalho.

Foram avaliadas características epidemiológicas e clínicas dos pacientes, conforme demonstrado (Tabela 3). É possível observar que a maioria dos pacientes é do sexo masculino, independentemente do grupo avaliado, sendo a média de idade geral de 50 anos. De maneira geral, é possível destacar para o fato da maioria dos pacientes respondedores receberem terapia combinada, ao passo que os não respondedores são de maioria de monoterapia.

Tabela 3 - Tabela de contingência.

	Respondedores (n = 15)	Não respondedores (n = 4)	Total (n = 19)
Média de idade, anos	61,7	48,9	50,0
Sexo, n (%)			
Masculino	8 (53,3)	4 (100)	12 (63,2)
Feminino	7 (46,7)	0 (0)	7 (36,8)
Tipo de tratamento, n (%)			
Curativo	2 (13,3)	2 (50)	4 (21)
Paliativo	11 (73,3)	2 (50)	13 (68,5)
Neoadjuvante	2 (13,3)	0 (0)	2 (10,5)
Estadiamento, n (%)			
III	3 (20)	2 (50)	5 (26,3)
IV	12 (80)	2 (50)	14 (73,3)
Tipo de tratamento, n (%)			
Anti-PD-1	1 (6,7)	3 (75)	4 (21)
Anti-PD-1 + Anti-CTLA-4	14 (93,3)	1 (25)	15 (79)

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL IMUNE CELULAR E SOLÚVEL NO BASELINE (T0)

A análise dos 48 fatores solúveis pôde demonstrar que houve diferença significativamente estatística apenas da quimiocina CXCL9 (também conhecido como monocina induzida por IFN- γ , ou MIG), com maiores quantidades em pacientes respondedores em relação aos não respondedores em tempo 0 ($p= 0,007$) (Figura 9).

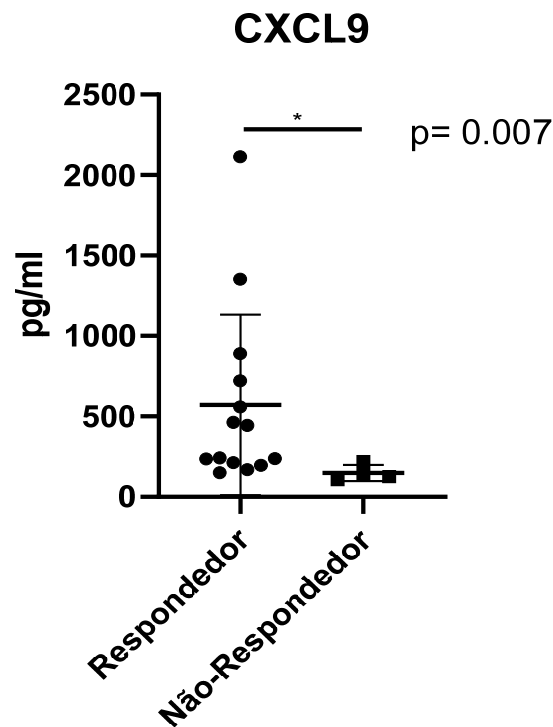


Figura 9 - Quantificação de CXCL9 por ensaio multiplex em pacientes com melanoma respondedores e não respondedores ao tratamento em tempo 0. Quantificação de CXCL9 por ensaio multiplex em pacientes com melanoma respondedores (n = 14) e não respondedores (n = 4) ao tratamento. O plasma foi coletado no momento anterior ao início do tratamento (tempo 0), e utilizado para quantificação da quimiocina.

Para a caracterização do perfil imune celular, ainda em tempo 0, foram comparadas as diferentes populações celulares entre os pacientes respondedores e não respondedores, e o único que teve diferença estatisticamente significativa foi em linfócitos totais, com valores aumentados em pacientes não respondedores ($p= 0,02$) (Figura 10).

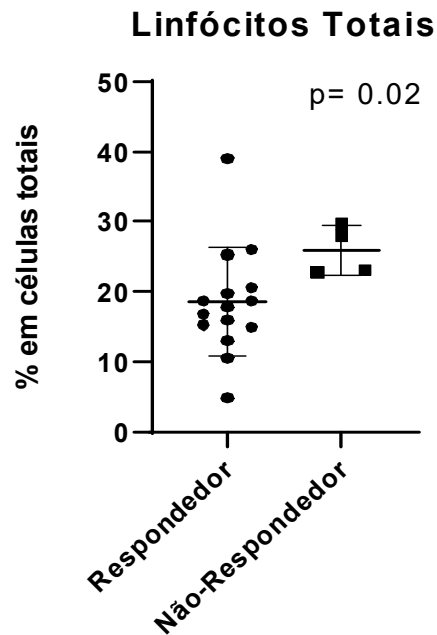


Figura 10 - Porcentagem de linfócitos totais no sangue periférico de pacientes com melanoma respondedores e não respondedores ao tratamento em tempo 0. Porcentagem de linfócitos totais no sangue periférico de pacientes com melanoma respondedores (n = 15) e não respondedores (n = 4) ao tratamento. O sangue periférico foi coletado no momento anterior ao início do tratamento (tempo 0), e a avaliação realizada por citometria de fluxo.

Decidimos demonstrar as células que apresentaram diferenças entre os perfis, e com um valor de p de até 0,19 – que, apesar de não indicar com força estatística um possível biomarcador, são capazes de demonstrar uma caracterização dos perfis de resposta (Figura 11).

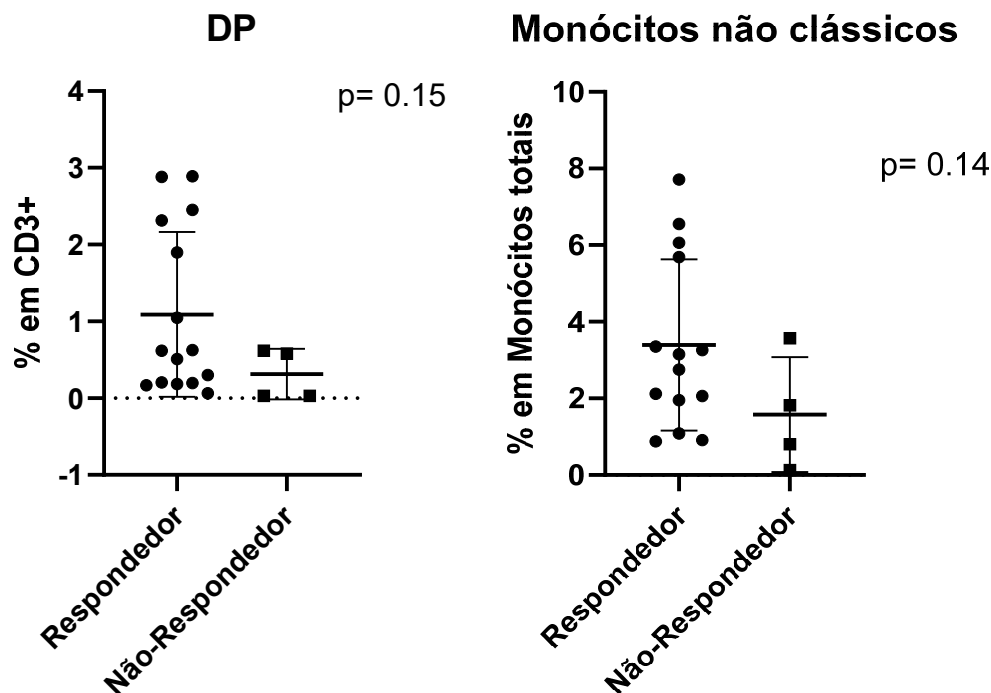


Figura 11 - Porcentagem de linfócitos duplo positivos a partir das células CD3+ (linfócitos T) e monócitos não clássicos a partir dos monócitos totais no sangue periférico de pacientes com melanoma respondedores e não respondedores em tempo 0. Porcentagem de linfócitos duplo positivos a partir das células CD3+ (linfócitos T) e monócitos não clássicos a partir dos monócitos totais no sangue periférico de pacientes com melanoma respondedores (n DP = 15; n monócitos não clássicos = 14) e não respondedores (n ambos = 4) ao tratamento. O sangue periférico foi coletado no momento anterior ao início do tratamento (tempo 0), e a avaliação realizada por citometria de fluxo.

Foi feito um *heatmap* para observar o comportamento dessas células em relação à resposta, tipo de resposta e estadiamento da doença, e é possível observar a inversão entre monócitos e linfócitos totais (indicado pela seta preta), onde os monócitos apresentam maior concentração em um grupo dos pacientes respondedores, enquanto os linfócitos totais apresentam comportamento completamente inverso, estando aumentados na região onde se tem uma maior concentração de pacientes não respondedores. É possível observar também uma clusterização de pacientes com valores aumentados de linfócitos duplo positivos (DP) em um grupo pacientes respondedores (retângulo preto) (Figuras 12). Apesar da congruência entre os resultados observados e o *heatmap*, é possível observar também que existem *clusters* diferentes para respondedores, o que podem indicar uma heterogeneidade dentro dos pacientes respondedores.

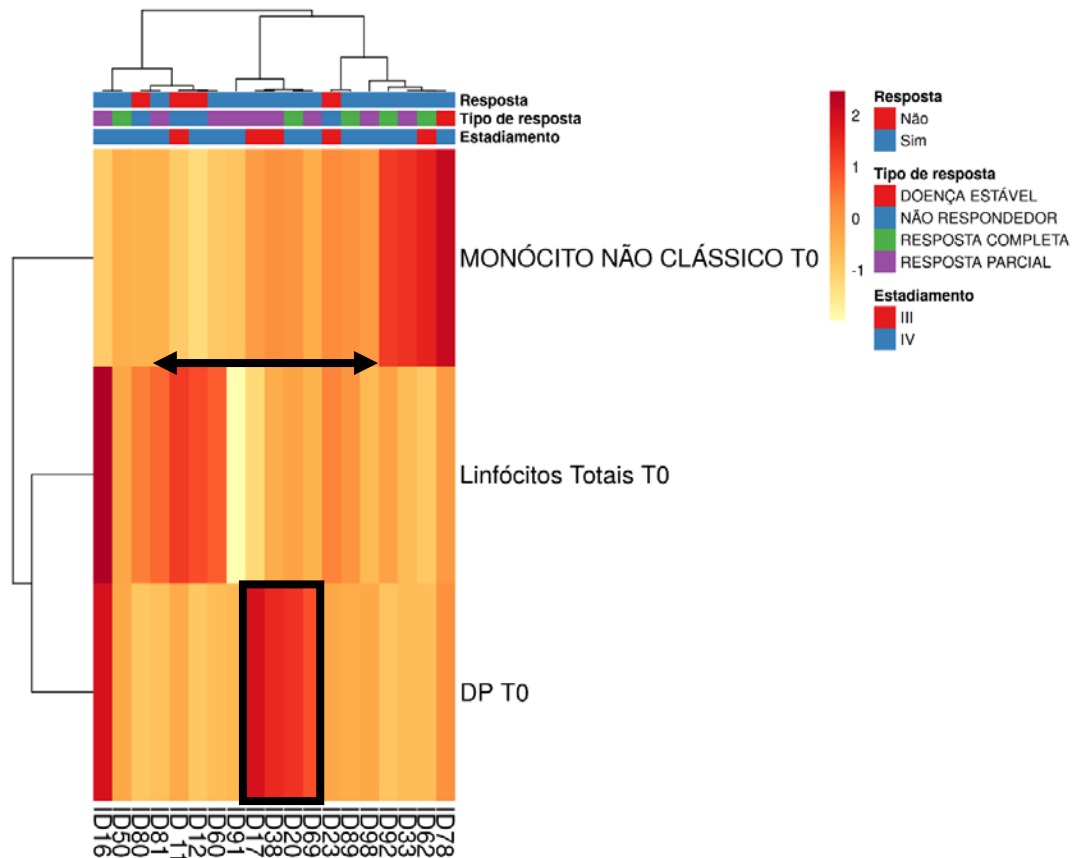


Figura 12 - Heatmap para as populações celulares no tempo 0 que tiveram valor de p menor que 0,19 agrupadas de acordo com a resposta ao tratamento, tipo de resposta e estadiamento da doença.

Para continuar a caracterização dos perfis dos pacientes respondedores e dos não respondedores, foi criada uma matriz de correlação para os dois perfis, entre as citocinas e as populações celulares destacadas até aqui, de modo a compreender melhor as correlações entre eles, e conseguir explicar as diferenças de perfis. Contudo, não houve correlação entre a citocina com significativa estatística (CXCL9) e as populações celulares com diferenças significativas e com tendências (linfócitos totais, linfócitos duplo positivos e monócitos não clássicos) nem nos pacientes respondedores, nem nos não respondedores (Figura 13).

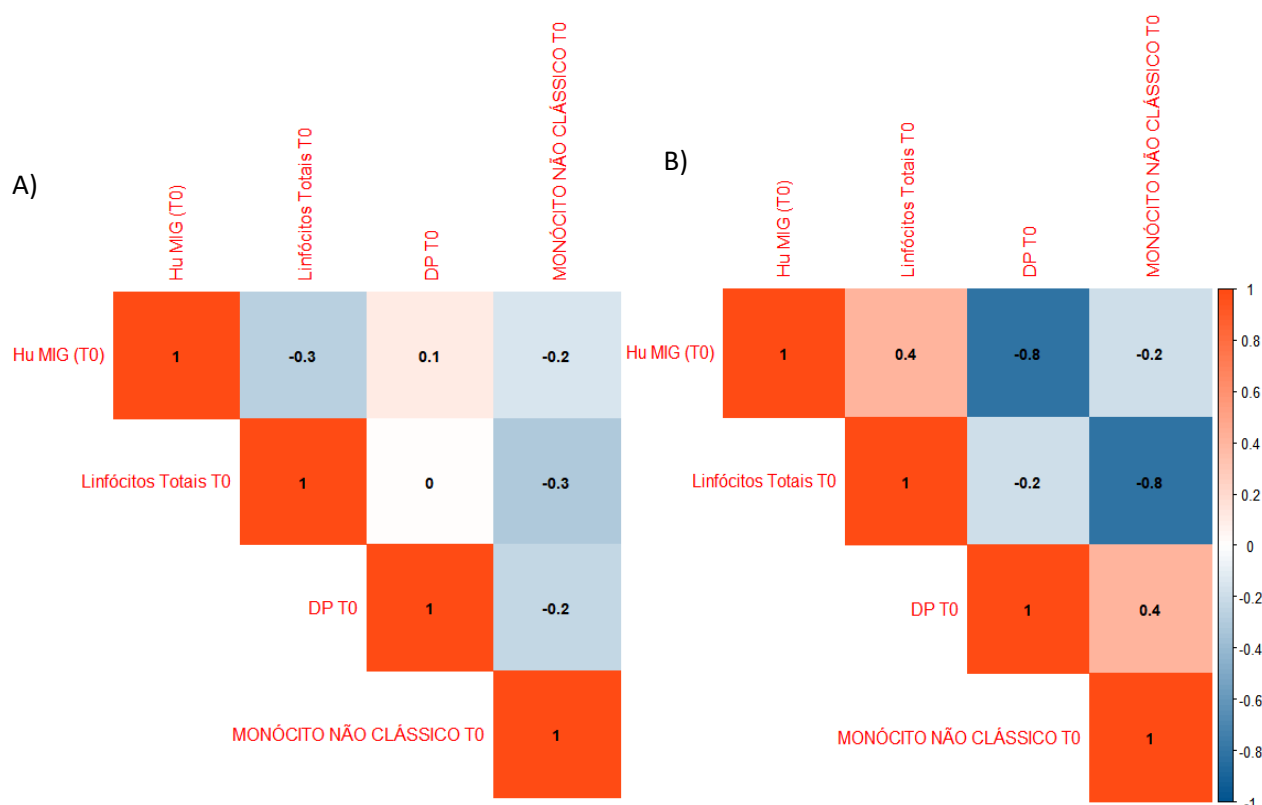


Figura 13 - Matriz de correlação para pacientes respondedores (A) e não respondedores (B) à imunoterapia do tempo 0. Matriz de correlação utilizando teste de *Spearman* para pacientes com melanoma respondedores (A) ou não respondedores (B) ao tratamento com imunoterapia. Foram avaliados perfis imunes solúvel e celular sistêmicos no momento anterior ao início do tratamento

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL IMUNE CELULAR E SOLÚVEL APÓS INÍCIO DO TRATAMENTO (3 SEMANAS)

Com a intenção de caracterizar os perfis dos pacientes de ambos os grupos, as mesmas informações foram analisadas no T1 (3 semanas), com a intenção de entender melhor a resposta do sistema imune ao início do tratamento, mas ainda em um momento anterior à classificação de resposta (que ocorre com 12 semanas). Achando um biomarcador neste ponto em tempo, pode ser ainda de grande ajuda para decisões clínicas e para fornecer um prognóstico para o paciente.

A mensuração das citocinas desse momento apresentou muito mais diferenças em relação ao *baseline*, especialmente porque a estimulação sistêmica do sistema imune pelo tratamento permitiu aumentar os níveis das citocinas em geral, já que no *baseline* a maioria dos valores eram muito baixos, e bem próximos do limite de detecção da nossa técnica. É possível

observar que todas as citocinas que apresentaram diferenças significativas (CXCL9, TNF- α , IL-2R α e IFN- γ) e que apresentaram valores aumentados com diferença importante (G-CSF, TRAIL, IL-12 (p40) e MCP-3) estiveram aumentadas no grupo de pacientes respondedores quando comparados ao grupo de não respondedores, com diferenças estatisticamente significativas (Figura 14) ou com diferenças que consideramos importantes com valor de p de até 0,1 (Figura 15).

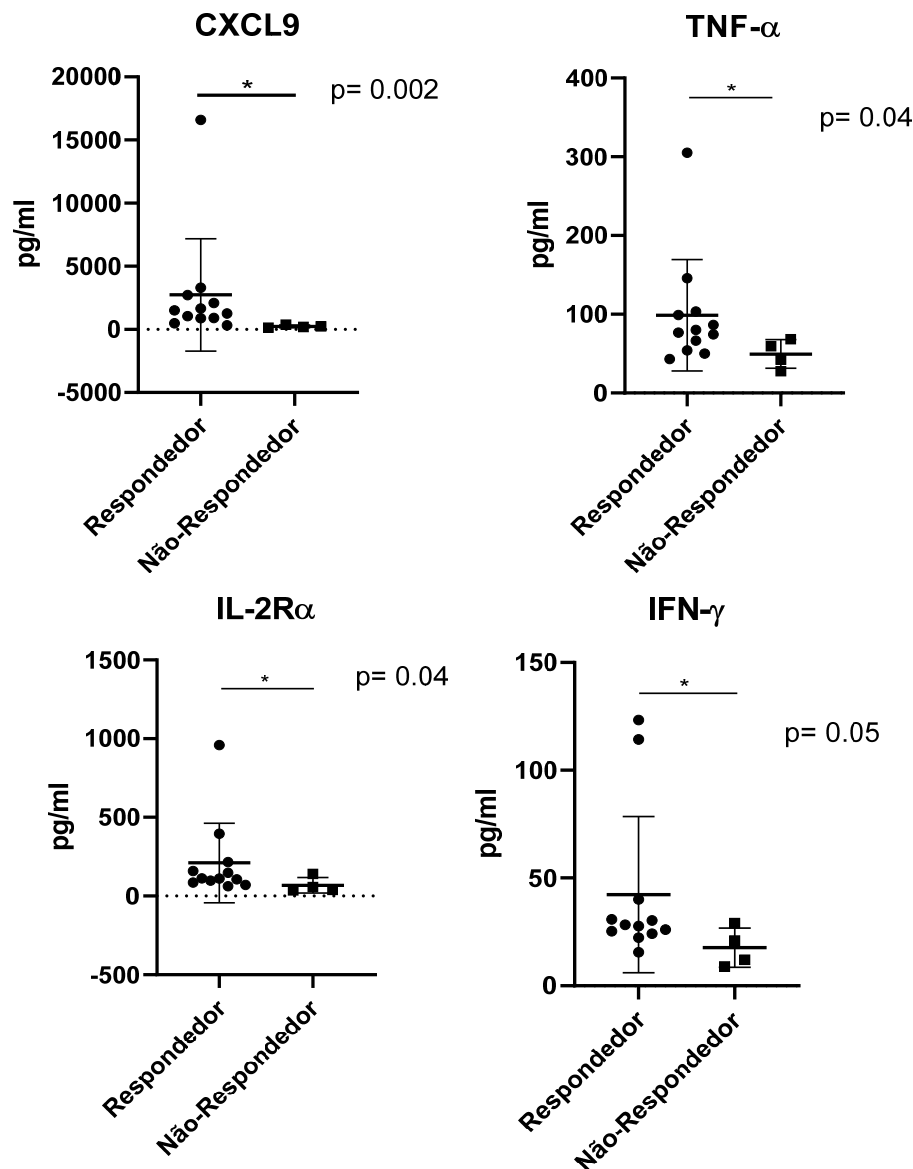


Figura 14 - Quantificação de CXCL9, TNF- α , IL-2R α e IFN- γ por ensaio multiplex em pacientes com melanoma respondedores e não respondedores em tempo 1. Quantificação de CXCL9, TNF- α , IL-2R α e IFN- γ por ensaio multiplex em pacientes com melanoma respondedores (n = 12) e não respondedores (n = 4) ao tratamento. O plasma foi coletado 3 semanas após o início do tratamento (tempo 1), e utilizado para quantificação das quimiocinas.

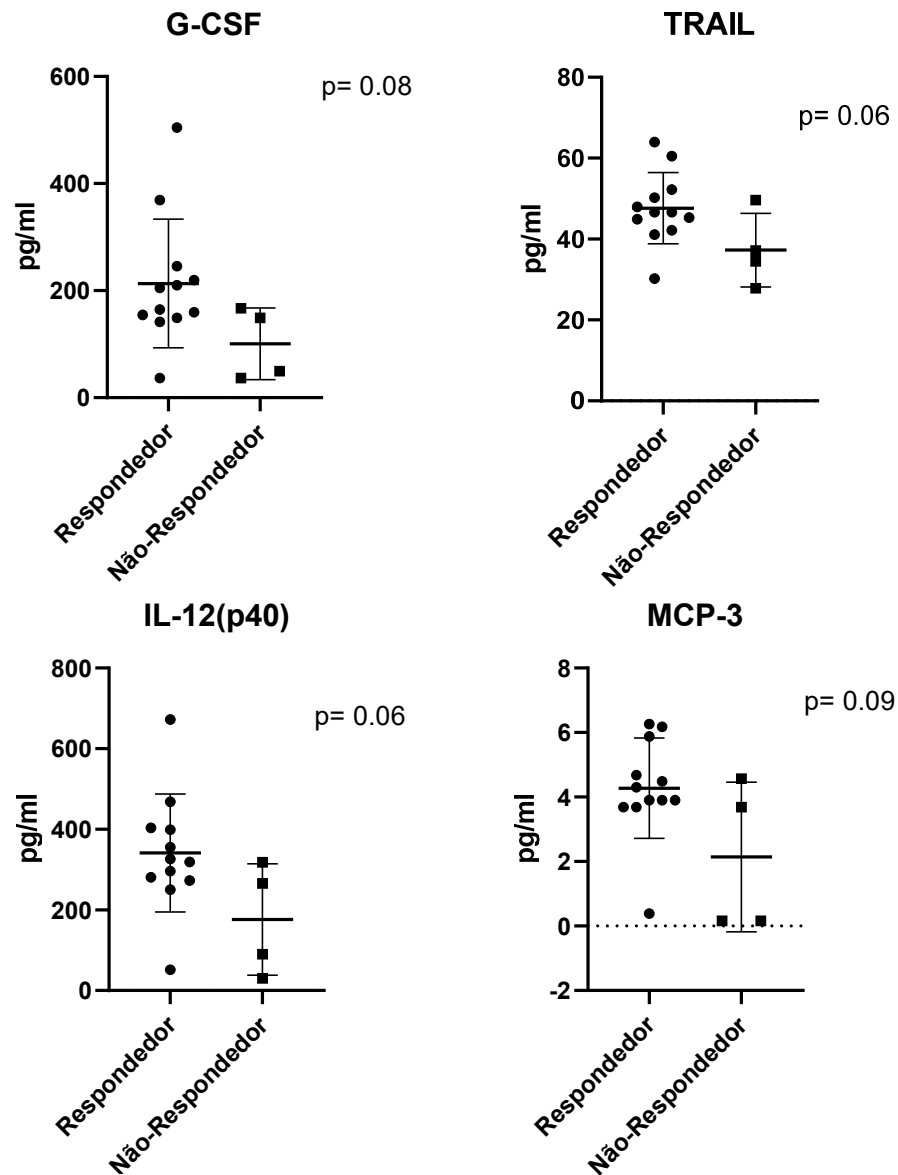


Figura 15 - Quantificação de G-CSF, TRAIL, IL-12(p40) e MCP-3 por ensaio multiplex em pacientes com melanoma respondedores e não respondedores em tempo 1. Quantificação de G-CSF, TRAIL, IL-12(p40) e MCP-3 por ensaio multiplex em pacientes com melanoma respondedores ($n = 12$) e não respondedores ($n = 4$) ao tratamento. O plasma foi coletado 3 semanas após o início do tratamento (tempo 1), e utilizado para quantificação das quimiocinas

Para melhor entender se os mesmos pacientes respondedores tinham valores aumentados para as citocinas destacadas, foi feito um *heatmap* de forma binária: os pacientes com valores acima da mediana tinham o número 1, e os abaixo da mediana o número 0. Dessa forma, foi possível observar que realmente um grupo de pacientes respondedores tinham valores aumentados para a maioria das citocinas (retângulo azul), enquanto os pacientes não

respondedores tinham os valores abaixo da mediana para as citocinas (retângulo vermelho) (Figura 16).

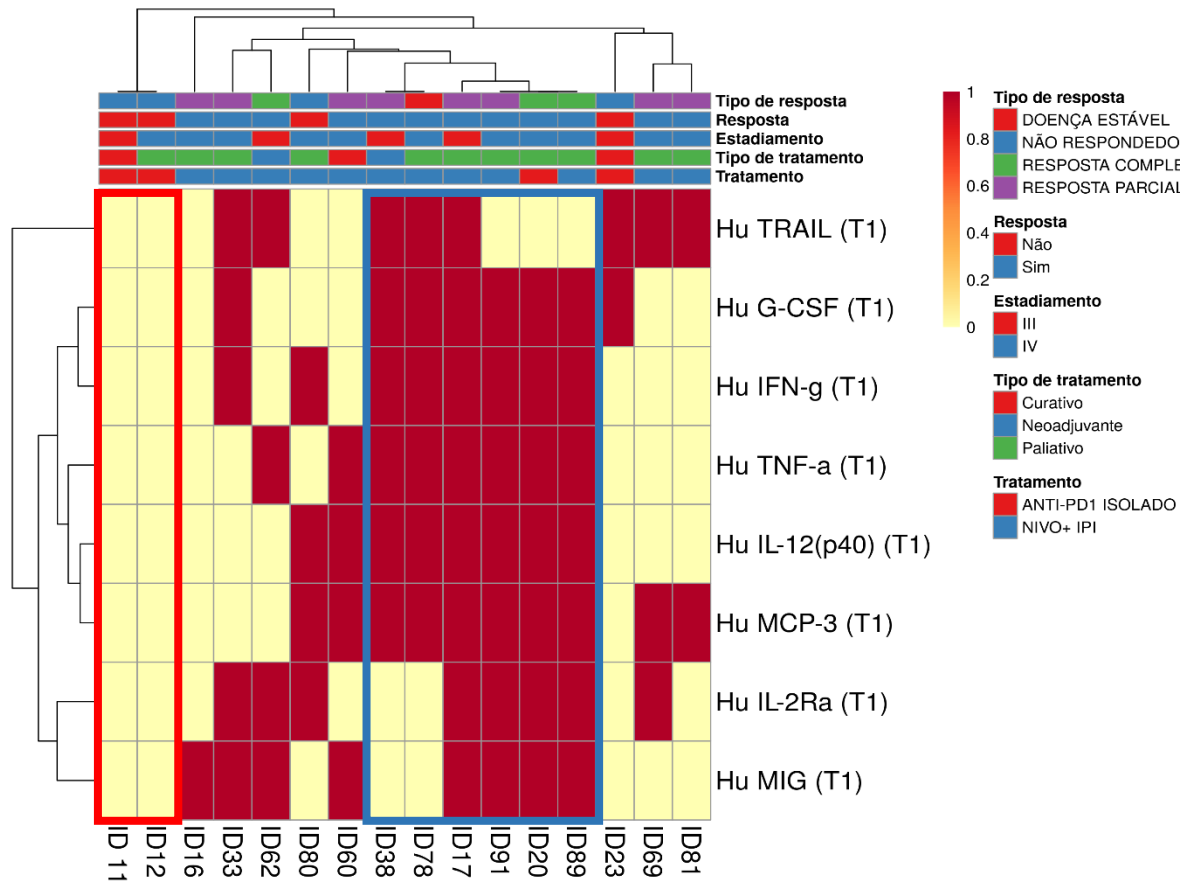


Figura 16 - Heatmap das citocinas no tempo 1, separadas por 0 e 1 para valores abaixo e acima da mediana, respectivamente, com parâmetros como: resposta e tipo de resposta, estadiamento da doença, tratamento e tipo de tratamento.

Para a caracterização do perfil imune celular foi seguido o mesmo racional e foram comparadas as diferentes populações celulares entre os pacientes respondedores e não respondedores, e a única população que teve diferença estatisticamente significativa foi a de monócitos totais, com valor de $p = 0,008$. Porém, diferentemente do que foi visto em T0, onde os monócitos não clássicos estavam com valores aumentados nos respondedores, em T1 a frequência de monócitos totais aparece aumentada em pacientes não respondedores (Figura 17).

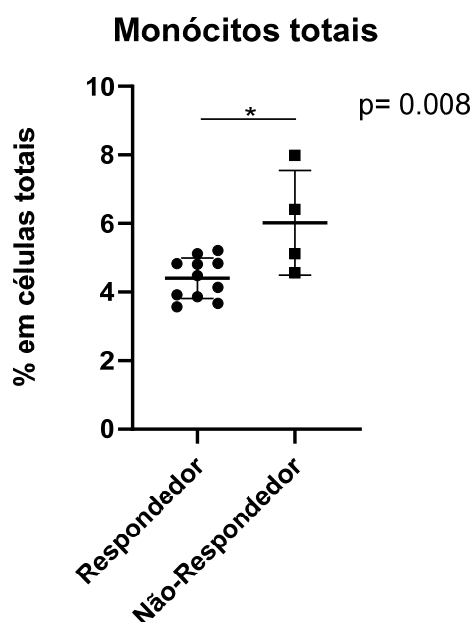


Figura 17 - Porcentagem de monócitos totais no sangue periférico de pacientes com melanoma respondedores e não respondedores em tempo 1. Porcentagem de monócitos totais no sangue periférico de pacientes com melanoma respondedores (n = 11) e não respondedores (n = 4) ao tratamento. O sangue periférico foi coletado no após o início do tratamento (tempo 1), e a avaliação realizada por citometria de fluxo.

E, novamente pelo racional da caracterização dos perfis nos diferentes tempos, decidimos avaliar as populações celulares que apresentaram diferenças entre os perfis, e com um valor de p de até 0,19 – que, novamente, apesar de não indicar com força estatística um possível biomarcador, são capazes de demonstrar uma caracterização dos perfis de resposta (Figura 18). Células CD3+ (linfócitos T), linfócitos T CD8+ e duplo negativos foram mais frequentes em pacientes respondedores, enquanto células NK e linfócitos B, foram mais frequentes em pacientes não respondedores.

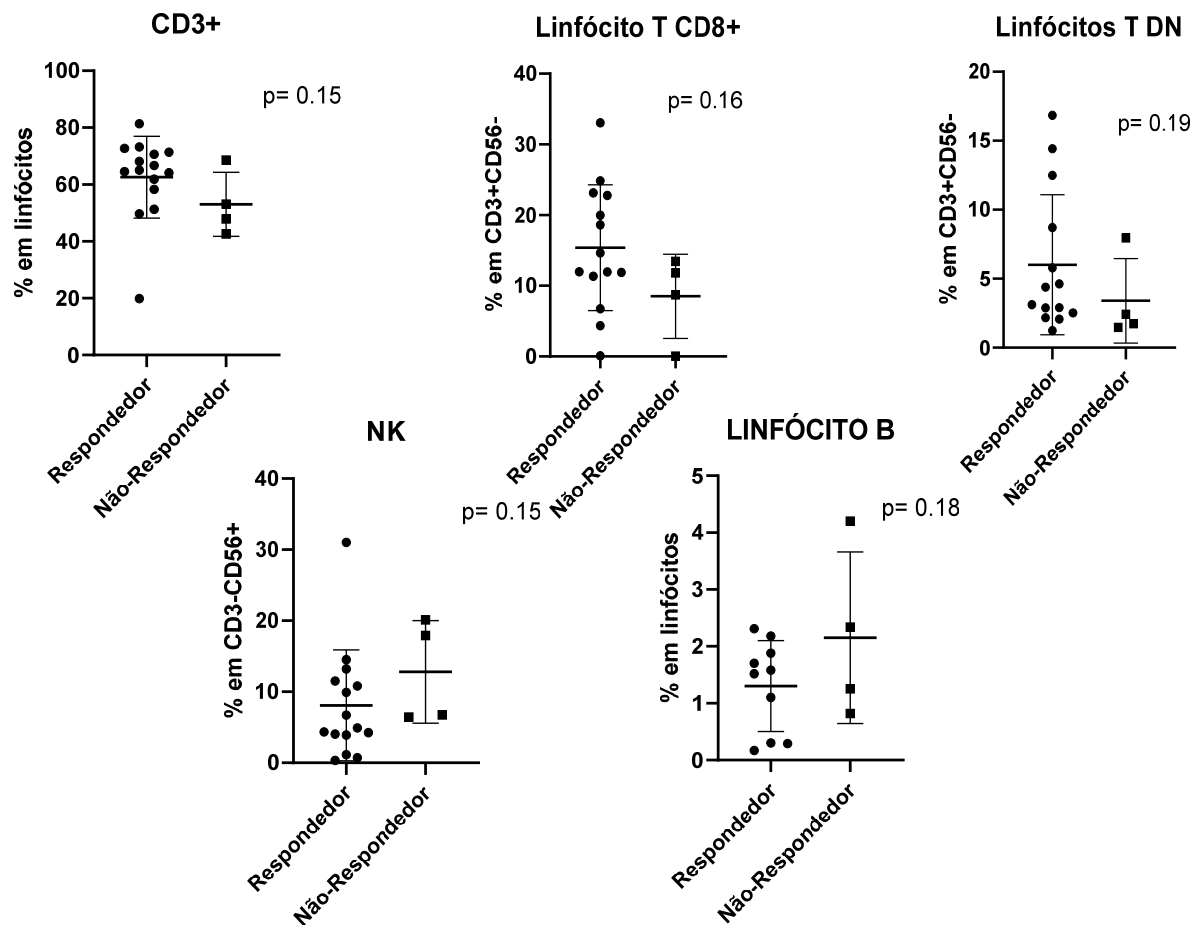


Figura 18 - Porcentagem de CD3+, linfócitos T CD8+, duplo negativos (DN), células NK e linfócitos B no sangue periférico de pacientes respondedores e não respondedores em tempo 1. Porcentagem de CD3+ a partir de linfócitos totais, linfócitos T CD8+ e duplo negativos (DN) a partir das células CD3+CD56-, células NK em CD3-CD56+ e linfócitos B em linfócitos totais no sangue periférico de pacientes respondedores (n CD3+ = 15; n T CD8+ = 14; n T DN = 14; n NK = 15; n Linfócito B = 10) e não respondedores (n = 4) ao tratamento. O sangue periférico foi coletado no após o início do tratamento (tempo 1), e a avaliação realizada por citometria de fluxo.

Com a intenção de observar o comportamento dessas células em relação aos mesmos parâmetros de respostas e tratamentos observados em T0, foi feito um *heatmap* onde é possível observar o mesmo comportamento visto anteriormente, com linfócitos T (CD3+), linfócitos T CD8+ e linfócitos T DN demonstrando valores aumentados para os pacientes respondedores (retângulos pretos). Em relação aos não respondedores, apesar de não haver uma clusterização clara para esse grupo, é possível observar que células NK, linfócitos B e monócitos totais tem valores aumentados em alguns pacientes (Figura 19).

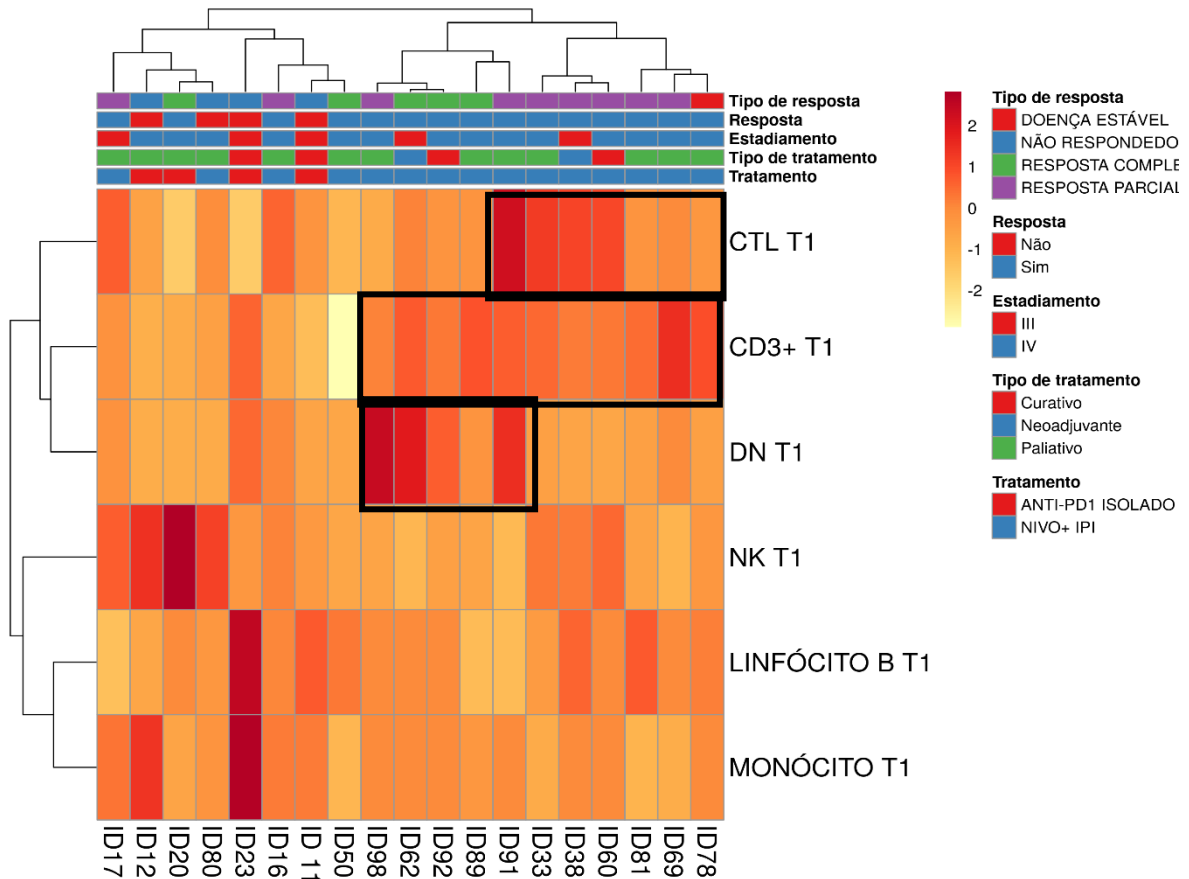


Figura 19 - Heatmap das populações celulares que tiveram valor de p menor que 0,19 com diversos parâmetros para clusterização

Novamente visando a melhor caracterização dos perfis, porém neste momento após o início do tratamento, foi feita uma nova matriz de correlação entre as citocinas destacadas e todas as populações celulares, de modo a conseguir explicar melhor as correlações entre eles. Para ambas foi aplicado teste de *Spearman*, para os respondedores o valor de p considerado significativo das relações foi de 0,05, enquanto para os não respondedores – devido ao menor n – foi de 0,1. Os valores que deram significativos apresentam um asterisco abaixo do valor (Figura 20). Diferentemente do tempo 0, neste momento após o início do tratamento já é possível observar correlações entre citocinas e células (como G-CSF e monócitos em respondedores), assim como entre as citocinas (IFN- γ e TNF- α em não respondedores) e entre populações celulares (linfócitos T CD8+ e monócitos em não respondedores).

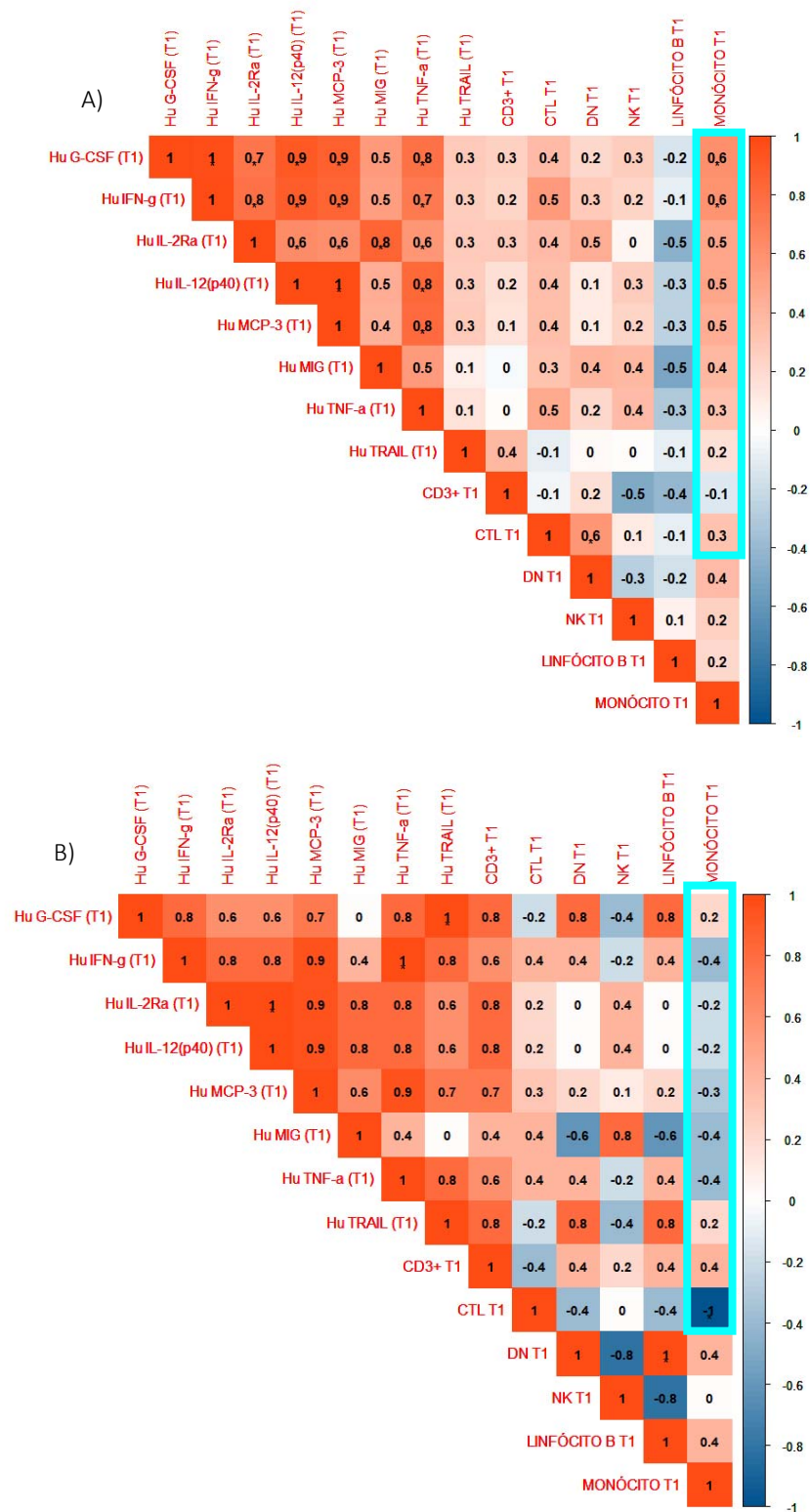


Figura 20 - Matriz de correlação para pacientes respondedores (A) ou não respondedores (B) à imunoterapia em tempo 1. Matriz de correlação utilizando teste de Spearman para pacientes com melanoma respondedores (A) ou não respondedores (B) ao tratamento com imunoterapia. Foram avaliados perfis imunes solúvel e celular sistêmicos no momento após o início do tratamento. (valor considerado significativo para pacientes não respondedores $p < 0,1$).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL IMUNE CELULAR E SOLÚVEL DE ACORDO COM O TEMPO

Entender os perfis imunes nos diferentes tipos de resposta, antes e após o tratamento, dá uma ideia pontual do sistema imune daqueles momentos e, na busca de compreender a dinâmica dos fatores solúveis e celulares, foram feitas análises em *log fold change*, isto é, dividindo os valores obtidos nas mensurações de T1 pelo T0, e o resultado colocado em log base 2, para entender sobre valores que aumentaram ou diminuíram após o início do tratamento.

O aumento de CXCL9 foi maior em pacientes respondedores, além de seus níveis já estarem aumentados neste grupo mesmo antes do início do tratamento (Figura 21). IL-2R α , IFN- γ , G-CSF, TRAIL e IL-12(p40) são citocinas que apareceram já aumentadas em tempo 1 no grupo de pacientes respondedores, mas não no tempo 0, e consequentemente quando analisadas em função do aumento ao longo do tempo, essa diferença fica mais evidente. MIP-1 α e IL-6 foram citocinas que não tinham demonstrado diferença entre os grupos até então, mas que demonstraram ter um aumento importante nos pacientes respondedores quando comparados com os não respondedores (Figura 22).

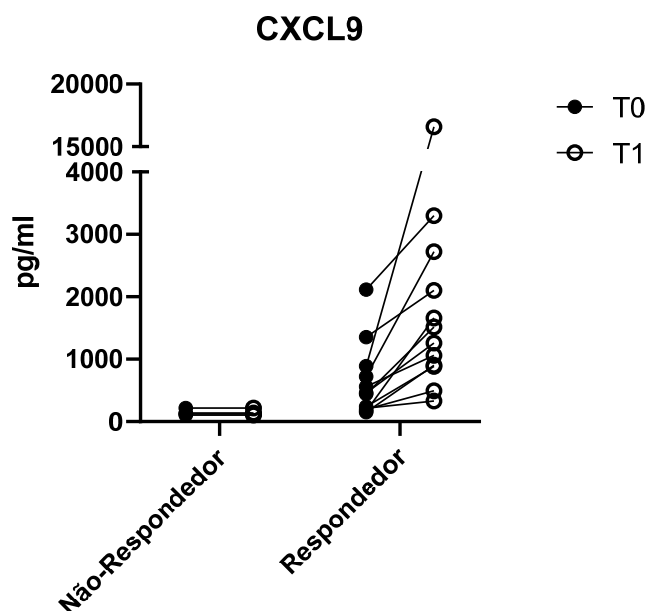


Figura 21 – Comparação dos valores de CXCL9 em T0 e T1 em pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento. Comparação das mensurações de CXCL9 nos tempos 0 e 1, entre os pacientes respondedores (n = 12) e não respondedores (n = 4).

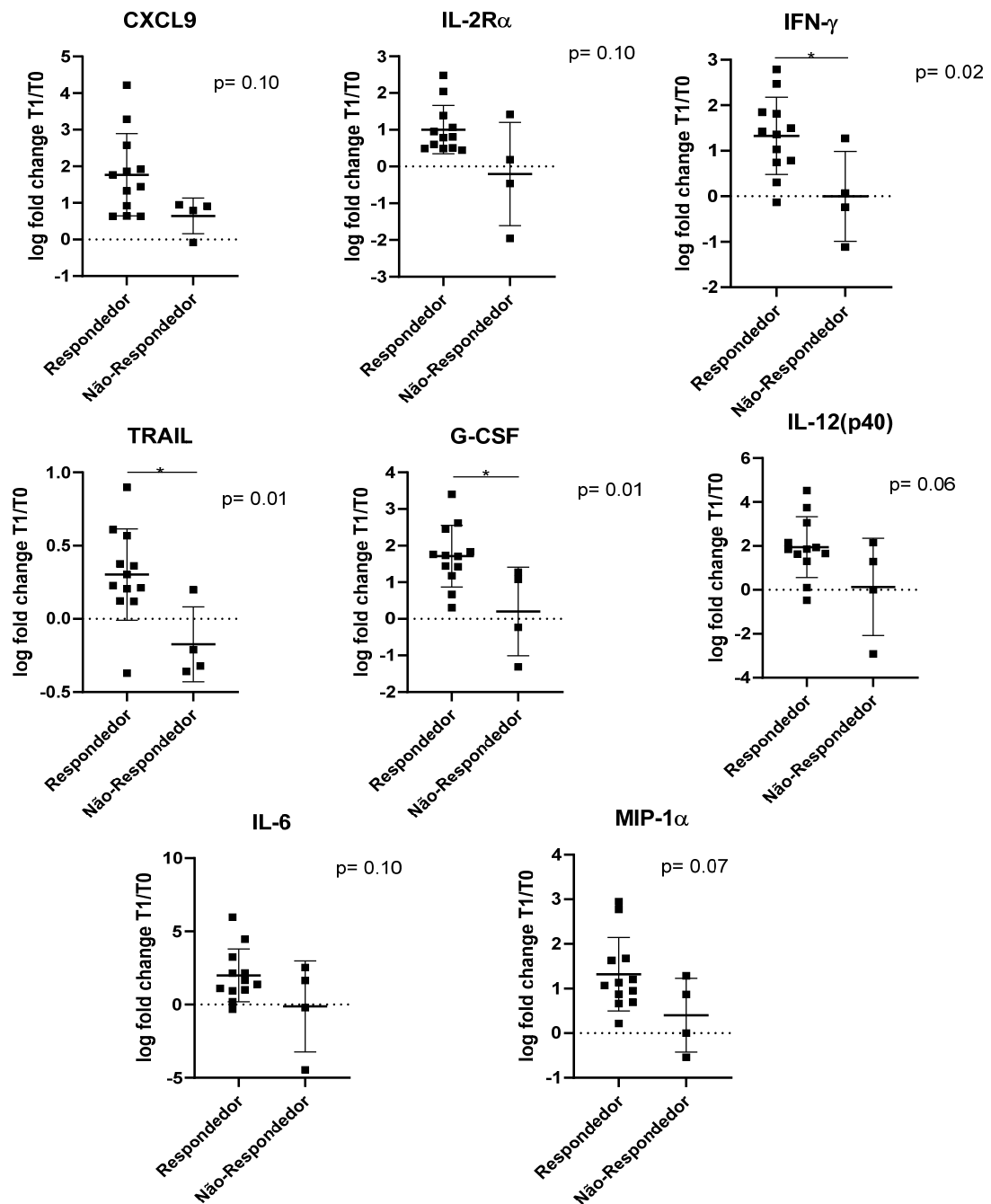


Figura 22 - Quantificação de CXCL9, IL-2R α , IFN- γ , TRAIL, G-CSF, IL-12 (p40), IL-6 e MIP-1 α em pacientes respondedores e não respondedores em *fold change*. Quantificação de CXCL9, IL-2R α , IFN- γ , TRAIL, G-CSF, IL-12 (p40), IL-6 e MIP-1 α por ensaio multiplex em pacientes com melanoma respondedores (n = 12) e não respondedores (n = 4) ao tratamento. As análises foram realizadas com os valores de log *fold change*

Para uma interpretação mais visual dos resultados, novamente foi feito um *heatmap* com as amostras identificadas apenas como 0 ou 1, sendo menores ou maiores que o valor da mediana, respectivamente (Figura 23). Desse tipo de *heatmap* é possível perceber que na sua maioria, são os mesmos pacientes que apresentam valores acima da mediana e abaixo da

mediana para todas as citocinas, assim como esse comportamento condiz com a observação de que os maiores valores são dos pacientes respondedores (retângulo azul), e os menores, dos não respondedores (retângulo vermelho).

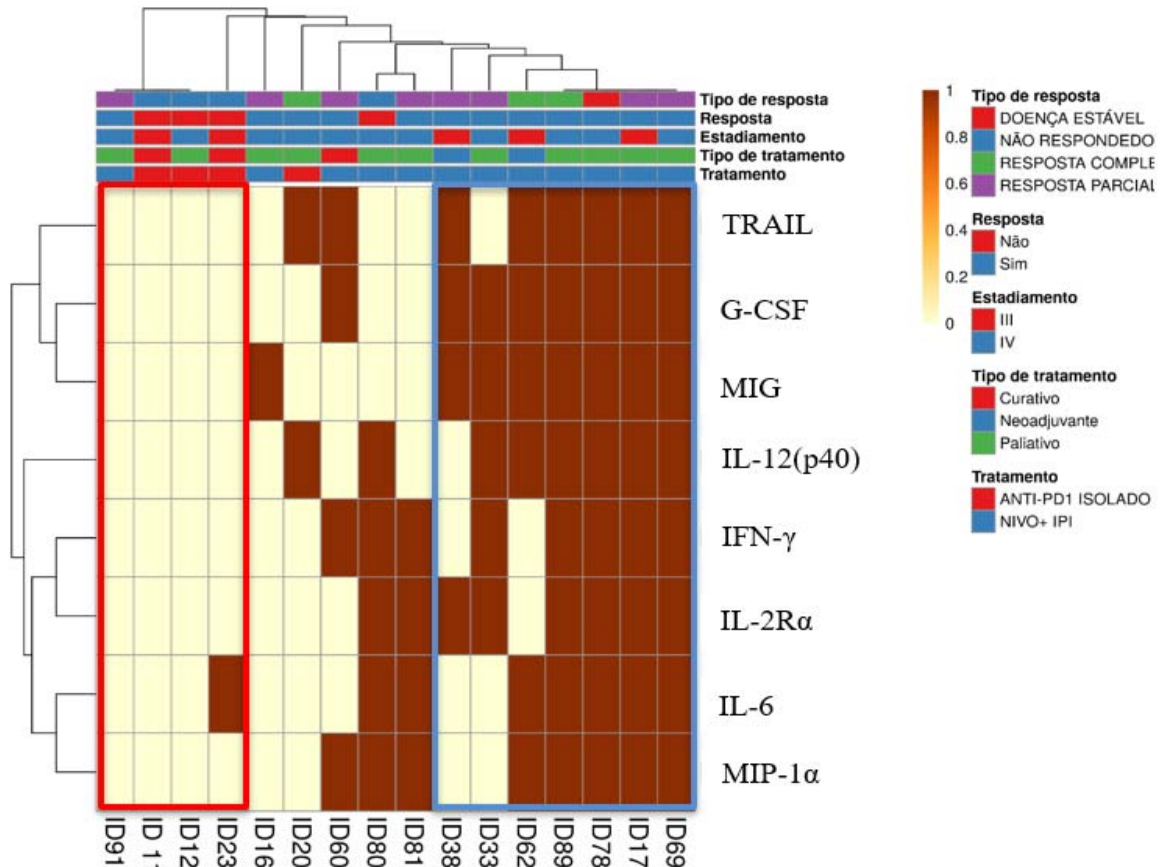


Figura 23 - Heatmap das citocinas em *fold change*, separadas por 0 e 1 para valores abaixo e acima da mediana, respectivamente, com parâmetros como: resposta e tipo de resposta, estadiamento da doença, tratamento e tipo de tratamento.

A mesma análise de diferença foi aplicada para as populações celulares, para poder entender de forma dinâmica os diferentes perfis. Monócitos totais e não clássicos demonstram ter aumentado mais no T1 para os não respondedores do que para os respondedores. Os monócitos totais já apresentavam com valores aumentados para os não respondedores no T1, porém os não clássicos apareciam aumentados para os respondedores no *baseline*. Células NKT CD4⁺ foi a população que não tinha demonstrado diferença entre os grupos até então, mas que demonstrou ter um aumento importante nos pacientes não respondedores quando comparados aos respondedores (Figura 24).

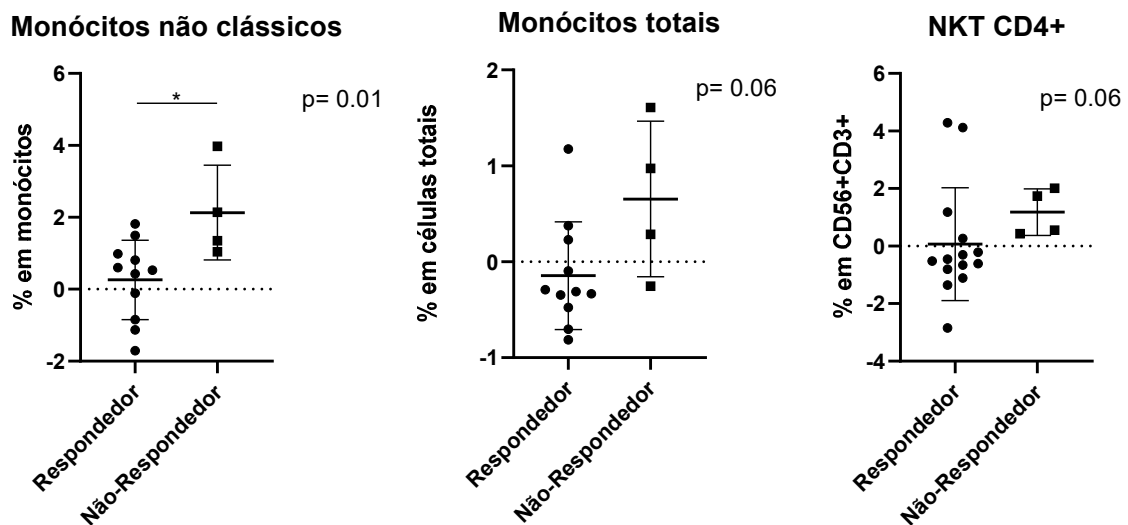


Figura 24 - Porcentagem de monócitos totais e não clássicos, e de NKT CD4+ sangue periférico de pacientes com melanoma respondedores e não respondedores em *fold change*. Porcentagem de monócitos totais (em células totais) e não clássicos (em monócitos totais), e de NKT CD4+ em CD56+CD3+ no sangue periférico de pacientes com melanoma respondedores (n monócitos = 11; n NKT CD4+ = 14) e não respondedores (n = 4) ao tratamento. As análises foram realizadas com os valores de log *fold change*

5.5 IDENTIFICAÇÃO DE UM POSSÍVEL BIOMARCADOR

A intenção de buscar um biomarcador é poder fazer uma análise antes do paciente ser submetido ao tratamento, que possa predizer suas chances de resposta ou não. Por isso, analisando as informações obtidas no *baseline*, considerando tanto o perfil imune celular quanto solúvel, uma quimiocina chamou bastante a atenção: CXCL9. Ela desde o T0 se apresenta com diferença estatisticamente significativa, tendo valores aumentados em pacientes respondedores. O mesmo perfil é observado no T1 e, na dúvida se eles são diferentes porque apenas permanecem aumentados nos respondedores, quando observamos o log *fold change* é possível entender que eles têm a capacidade de aumentar ainda mais após o início do tratamento. Por isso, foi feito uma regressão logística a fim de explicar a influência que essa citocina tem sobre o desfecho, que é a resposta. Foi feito também uma curva ROC, a fim de mensurar a acurácia dela como um biomarcador (Figura 25 e Tabela 4).

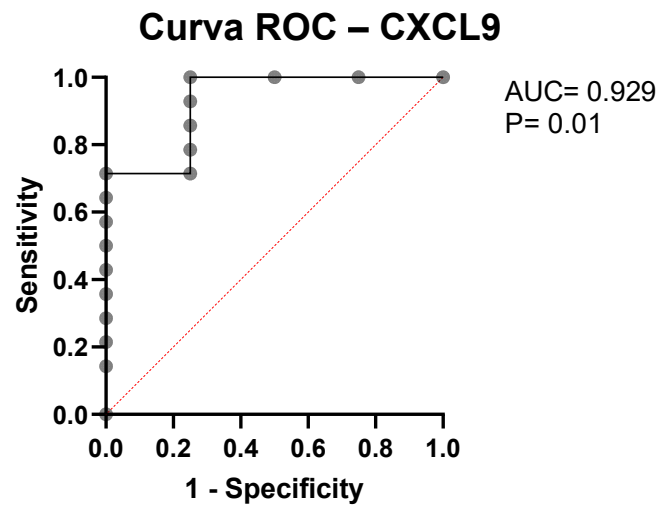


Figura 25 - Curva ROC de CXCL9.

Tabela 4 - Informações estatísticas da curva ROC (área embaixo da curva e valor de p) e valores estatísticos da regressão logística (valor de p, *odds ratio* (OR), e intervalo de confiança (IC) de 95%)

Curva ROC					
Variável	AUC	P	P valor (regressão)	OR	IC 95%
CXCL9	0,929	0,01	0,002	1,03	1,01 até 1,09

6 DISCUSSÃO

A taxa de resposta dos pacientes do estudo, com os dois tipos de terapia considerados juntos (monoterapia de anti-PD-1 e combinação de anti-PD-1 com anti-CTLA-4) é de cerca de 78%. Apenas a monoterapia tem uma taxa de 25%, e apenas a combinada de cerca de 93% de resposta. Em relação à literatura, a monoterapia corresponde à média entre 20 e 30% de resposta, porém a terapia combinada supera a média de 50 a 60% de resposta⁴¹, e esses valores podem estar fora do descrito pela literatura pela limitação no número de pacientes do trabalho.

De modo geral, o entendimento do perfil imune dos pacientes com diferentes perfis de resposta se faz necessário para a conduta mais direcionada por parte dos clínicos a fim de evitar tratamentos onde já seria possível prever a falta de eficácia. Por isso o estudo se propôs a observar e caracterizar esse perfil no momento antes ao início do tratamento, e logo após o início, de modo a entender qual o perfil dos pacientes que tendem a responder, bem como poder identificar biomarcadores que possam prever essa resposta.

De acordo com o analisado em tempo 0, foi possível observar valores aumentados sem significância estatística em monócitos não clássicos ($p=0,14$) e em linfócitos duplo positivos ($p=0,15$) (Figura 11), e diferença estatisticamente significativa em CXCL9 ($p=0,007$) (Figura 9), assim como em linfócitos totais ($p=0,02$) (Figura 10).

CXCL9 é uma citocina que vem sendo estudada ultimamente no contexto de melanoma. Esta citocina, produzida por células dendríticas, faz a quimioatração das células T citotóxicas e NK (ambas contêm CXCR3) e consequentemente leva à ativação destas células após apresentação de antígenos pelas próprias células dendríticas aos linfócitos. Essa dinâmica, no contexto do melanoma, faz com que ocorra uma resposta anti-tumoral e consequentemente uma melhor resposta. Na literatura, sua presença aumentada sugere melhor resposta ao tratamento com imunoterapia⁴²⁻⁴⁴, assim como é visto nos nossos pacientes, porém ainda não existem trabalhos onde é feita análise de CXCL9 sistêmica, antes do início do tratamento.

Chow et al.⁴² demonstrou, em camundongos, que a resposta antitumoral induzida por anti-PD-1 é facilitada pela produção de CXCL9 pelas células dendríticas intratumorais. Em pacientes, foram analisados os níveis plasmáticos de CXCL9 nos pacientes respondedores e não respondedores tratados com monoterapias (somente anti-PD-1 ou somente anti-CTLA-4) ou com terapia combinada (anti-PD-1 com anti-CTLA-4), e foi observado aumento de CXCL9

após o início do tratamento, porém não foram observadas diferenças no *baseline*, como nos nossos pacientes.

House et al.⁴⁴ também descreveu a importância do CXCL9 na resposta à imunoterapia tanto em modelo murino quanto em pacientes. Nos pacientes, através de análise por *Single-cell RNA-seq* dos linfócitos infiltrantes tumorais, foi possível observar que tanto CXCL9 quanto CXCL10 e CXCL11 (todas ligantes de CXCR3) eram expressos predominantemente por macrófagos após o tratamento, e eles se relacionavam à resposta à imunoterapia.

Esses trabalhos reforçam o comportamento que observamos nos nossos resultados, onde o aumento do CXCL9 após o início do tratamento está relacionado à melhor resposta à imunoterapia, porém os dados que trazemos sobre seus valores já aumentados no *baseline* são novidade. Nossa demonstração pode servir de base para estudos mais aprofundados do uso do CXCL9 como biomarcador preditor de resposta anterior ao início do tratamento.

Os monócitos podem ser divididos de acordo com as suas características funcionais: monócitos clássicos, intermediários e não clássicos. Os clássicos, mais inflamatórios, após dias na circulação sem recrutamento para tecidos, podem ter dois diferentes caminhos: ou entram em apoptose, ou se diferenciam em não-clássicos (mais imunossupressores). Os monócitos não-clássico tem tal classificação por tem como característica, além de capacidade de fagocitar corpos apoptóticos, a capacidade de produção de CXCL2, que é um quimioatrativo para neutrófilos, e a habilidade de evitar a dispersão hematogênica de células tumorais⁴⁵.

Estudos com pacientes com melanoma metastático tratados com anti-CTLA-4 demonstraram o mesmo aumento de monócitos não-clássicos no *baseline* de pacientes respondedores. Eles explicaram tal correlação pela capacidade dos monócitos dos pacientes com tratamento com anti-CTLA-4 de levar à lise das células Treg por ADCC (citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos) e consequentemente evitar a supressão da resposta⁴⁶.

Linfócitos duplo positivos circulantes são normalmente associados à exposição viral, com características citotóxicas de uma CD8+, porém com produção de citocinas similares ao CD4+⁴⁷. É possível que tal função dupla esteja tendo uma relação com a resposta dos pacientes, tendo-se em vista que estavam em maiores quantidades nos pacientes respondedores.

Em relação às populações celulares, os valores de duas das três populações destacadas não apresentaram valores estatisticamente significativos, porém o padrão foi novamente observado no *heatmap* (Figura 12), onde é possível observar os valores inversamente relacionados entre os monócitos e os linfócitos, da mesma forma que visto anteriormente: com

os monócitos não clássicos com valores aumentados nos pacientes respondedores, e os linfócitos totais nos pacientes não respondedores.

Ao relacionar os perfis solúveis e celulares, foi possível observar que, antes do tratamento os pacientes que responderam tinham predominância de CXCL9, e maiores frequências, porém sem significância estatística, de monócitos não clássicos e linfócitos duplo positivos, enquanto os não respondedores têm predominância de linfócitos totais.

Para entender a relação entre os fatores encontrados, foi feita matriz de correlação nos perfis respondedores (Figura 13 - A) e não respondedores (Figura 13 - B). Não foi possível encontrar correlação entre CXCL9 e as populações destacadas. É possível que essa falta de correlação se dê por diversos fatores, como a limitação do número de pacientes, e a caracterização apenas das populações celulares, sem detalhamentos como estados de ativação ou exaustão, por exemplo.

De forma a entender o perfil como um todo, foram analisadas citocinas e populações celulares após 3 semanas do início do tratamento. Novamente CXCL9 ($p=0,002$) se demonstrou com uma diferença estatisticamente significativa, estando com valores mais altos nos pacientes respondedores, assim como TNF- α ($p=0,04$), IL-2R α ($p=0,04$) e IFN- γ ($p=0,05$) (Figura 14). Com diferença estatisticamente significativa entre as populações celulares, apenas monócitos totais ($p=0,008$), demonstrando valores aumentados nos pacientes não respondedores (Figura 17).

Para auxiliar na caracterizar dos perfis, consideramos citocinas sem significância estatística, mas com diferenças importantes, como G-CSF ($p=0,08$), TRAIL ($p=0,06$), IL-12(p40) ($p=0,06$) e MCP-3 ($p=0,09$), e todas com valores maiores nos pacientes respondedores (Figura 15). Entre as populações celulares, linfócitos T CD3+ ($p=0,15$), linfócitos T CD8+ ($p=0,16$) e linfócitos DN ($p=0,19$) aparecendo com maiores valores nos pacientes respondedores, e células NK ($p=0,15$) e linfócitos B ($p=0,18$) nos não respondedores (Figura 18).

É possível correlacionar diversos fatores avaliados no tempo 1 após o início do tratamento. Células CD3+CD8+ podem ter função anti-tumoral, que se dá pela produção de fatores como por exemplo IFN- γ , que estão envolvidos em diferenciação para perfil Th1, ativação de macrófagos, e também são sabidamente indutores de CXCL9, que tem função quimiotática para linfócitos, para migração e ativação e, conseqüentemente, está associada a melhores prognósticos em melanoma ⁴⁸. Os linfócitos T CD8+ sofrem um controle para evitar uma resposta inflamatória exacerbada, e uma das células responsáveis por esse controle são os linfócitos duplo-negativos (DN) ⁴⁹. Linfócitos T CD3+, linfócitos T CD8+, linfócitos T DN se demonstraram com possíveis diferenças entre os grupos, porém ainda não tem diferenças

estatisticamente significativas, enquanto as citocinas IFN- γ e CXCL9 estão aumentadas nos pacientes respondedores do estudo.

Granulocyte colony-stimulating factor-G-CSF tem sido descrito como uma citocina pró-angiogênica e com ações anti-inflamatórias. Normalmente em sinergia com *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*-GM-CSF, seu papel é de uma função pró-tumoral por ação anti-inflamatória, enquanto GM-CSF faz um papel anti-tumoral com função pró-inflamatória⁵⁰. Nos nossos pacientes, é possível que ela esteja aumentada nos pacientes respondedores como um contra-balanço em prol da homeostase devido ao aumento de outras citocinas pró-inflamatórias.

Por sua vez, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*-TRAIL já tem sua função bem estabelecida e ativa apoptose rápida em células tumorais, ativada pela ligação aos receptores de sinalização de morte DR4 e DR5⁵¹, sendo esperado encontrar em valores aumentados em pacientes respondedores. TNF- α , assim como TRAIL, também tem função pró-inflamatória e apoptótica para as células tumorais e também é observado com valores mais aumentados nos pacientes respondedores. Porém, pode ter função ambígua no melanoma, também estando envolvida com progressão tumoral. Em contexto de imunoterapia, já foi visto que seus altos níveis intratumorais estão relacionados com melhor resposta⁵².

A IL-12 estar com valores aumentados nos pacientes respondedores pode estar relacionada ao fato de ser produzida majoritariamente por células apresentadoras de antígenos (APCs) como células dendríticas, macrófagos e células B. Ela é considerada como uma das citocinas anti-tumorais mais potentes, devido à sua capacidade de gerar um perfil Th1 e, por isso, ter alta contribuição para produção de IFN- γ e citotoxicidade⁵³, sendo estudada também para ser aplicada com fins terapêuticos⁵⁴.

Também com valores aumentados nos pacientes respondedores, MCP-3 (ou CCL7) também tem função ambígua de acordo com a célula produtora⁵⁵. Em melanoma já foi visto que sua função pró-inflamatória está associada a sua capacidade de quimioatração de linfócitos T e células NK. Sua função anti-tumoral está diretamente ligada à essas células, uma vez que quando depletadas, MCP-3 perde a capacidade anti-tumoral⁵⁶.

IL-2R α , também conhecido como sCD25 é o antagonista solúvel de IL-2 e, por isso, tem função no controle imune. É sabido que altas concentrações são encontradas em pacientes com doenças autoimunes, infecção ou inflamações, o que demonstra ser um biomarcador de ativação do sistema imune. Uma de suas funções é a inibição da proliferação de células T CD8+ quando na presença de muita IL-2, além de poder se ligar com a IL-2 solúvel formando um complexo capaz de estimular a diferenciação de células Treg, tendo função supressora⁵⁷⁻⁵⁸. Sua

presença em valores aumentados nos pacientes respondedores demonstra a ativação do sistema imune, sendo sua função de gerar um controle para a atividade pró-inflamatória exacerbada.

Pela observação do *heatmap* binário (Figura 16), foi possível entender que de modo geral, os pacientes respondedores têm valores acima da mediana para todas as citocinas, enquanto os pacientes não respondedores têm valores abaixo da mediana também para todas as citocinas (TRAIL, G-CSF, IFN- γ , TNF- α , IL-12(p40), MCP-3, IL-2R α e CXCL9).

Em relação ao perfil imune celular, em um primeiro momento, monócitos não clássicos aparecem aumentados nos pacientes respondedores antes do início do tratamento, porém na mensuração após o início do tratamento os monócitos totais aparecem aumentados em não respondedores e, na análise de *log fold change*, a frequência de monócitos não clássicos aumentou mais após 3 semanas de início do tratamento no grupo de pacientes não respondedores. A maior frequência de monócitos não clássicos antes do início do tratamento em pacientes respondedores pode ser explicado devido à sua função de controle tumoral, porém, com o início do tratamento é possível perceber que os valores perderam a diferença entre os pacientes respondedores e os não respondedores, o que pode indicar que com o início do tratamento e com a alteração de outros fatores, os monócitos deixaram de ter função de interferir na resposta.

A frequência de linfócitos B na circulação em tempo 1 foi maior em pacientes não respondedores. Localmente, já foi visto que a maior presença de células B (CD20+) no tecido do melanoma primário está associado com uma maior sobrevida^{59,60}, e isso pode se dar devido ao fato de que linfócitos B respondem às células malignas de diferentes formas (por MHC, por reconhecimento de fatores solúveis, etc), levando a uma resposta imune anti-tumoral. Além da produção de citocinas, a produção dos anticorpos é extremamente relevante no controle tumoral (opsonização, neutralização de receptores, citotoxicidade gerada por células dependentes de anticorpos), também devendo ser considerados como potenciais biomarcadores de resposta. Entretanto, diferentes subpopulações de linfócitos B podem assumir diferentes perfis, como por exemplo B-1 produtores de IFN- γ – um perfil mais anti-tumoral, ou Breg produtoras de IL-10, com um perfil mais anti-inflamatório⁶¹. Nossos resultados refletem uma avaliação sistêmica, diferente do descrito pela literatura, sendo necessária uma investigação mais aprofundada do tipo de linfócito B para entender precisamente sua função e consequentemente sua ligação com a resposta.

Diferentemente do que se esperava, devido ao fato da função bem estabelecida das células NK de controle tumoral por citotoxicidade⁶², a frequência de células NK esteve aumentada nos pacientes não respondedores em tempo 1. Existem estudos que citam a produção

de metaloproteínas pelos fibroblastos associados ao melanoma, que diminuem a expressão dos ligantes de NK na célula tumoral (MICA/B) e consequentemente diminuem a atividade citotóxica dependente de ligante das células NK ⁶³.

Ao analisar as matrizes de correlação (Figura 20), é possível ver que as citocinas se correlacionam positivamente entre si, demonstrando um envolvimento entre elas no perfil de resposta. Entre os respondedores (Figura 20 – A), existem citocinas que se relacionam com outras citocinas (G-CSF e IFN- γ tem correlação positiva com IL-2R α , IL-12(p40), MCP-3, TNF- α e entre si; IL-2R α tem correlação positiva com IL-12(p40), MCP-3, CXCL9, TNF- α ; IL-12(p40) tem correlação positiva com MCP-3 e TNF- α ; MCP-3 tem correlação positiva com TNF- α). Curiosamente, os pacientes que responderam também apresentaram uma correlação positiva geral entre monócitos e citocinas inflamatórias e CTLs (retângulo azul). Entre os não respondedores (Figura 20 – B), também existem correlações entre as citocinas (G-CSF se correlaciona positivamente com TRAIL; IFN- γ se correlaciona positivamente com TNF- α ; IL-2R α se correlaciona positivamente com IL-12(p40)). No entanto, em contraste com o grupo de respondedores, os monócitos não mostraram uma correlação positiva com as citocinas inflamatórias (retângulo azul) (uma tendência geral de correlações negativas) e apresentaram uma correlação negativa com os CTLs. Esses achados corroboram os achados gerais de que os pacientes respondedores estabeleceram um perfil associado à correção das respostas inflamatórias, enquanto os pacientes que não responderam não mostraram essa correlação.

A análise de *fold change* serve para compreender o que está acontecendo com os pacientes ao longo do tempo. Em relação ao perfil solúvel é possível observar que as citocinas que apareceram diferencialmente presentes em respondedores e não respondedores em T1 se repetem, incluindo CXCL9, IL-2R α , IFN- γ , TRAIL, G-CSF e IL-12(p40). CXCL9 apesar de se demonstrar inicialmente já aumentada nos pacientes respondedores, demonstra que após o início do tratamento tem o comportamento de aumentar ainda mais em relação aos não respondedores. IL-2R α , IFN- γ , TRAIL, G-CSF e IL-12(p40) são citocinas que deram diferença apenas no T1, também com valores mais aumentados nos pacientes respondedores, sendo natural encontrá-las aumentadas também após a análise de *fold change*.

As citocinas IL-6 e MIP-1 α aparecem com um aumento entre o *baseline* e o T1, ambas com aumento mais significativo no grupo de pacientes respondedores. MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein* ou CCL3) também tem função inflamatória de recrutamento de linfócitos T, monócitos, células NK, células dendríticas, entre outras⁶⁴. Produzida principalmente por macrófagos e células endoteliais, a função de IL-6 como biomarcador é controversa, com trabalhos demonstrando seu aumento em *baseline* como um mau prognóstico em tratamento

com anti-CTLA-4⁶⁵, ou como um bom prognóstico com seu aumento em baseline de pacientes tratados com anti-PD-1⁶⁶.

Células NKT CD4⁺ aparecem como tendo um aumento nos pacientes não respondedores. As células NKT, de modo geral têm características funcionais similares às de células T, porém o reconhecimento de antígenos acontece via CD1d. Elas têm capacidades funcionais variáveis de acordo com as interações entre células e moléculas solúveis. As células NKT CD4⁺ podem produzir citocinas tanto de perfil Th1 tanto de perfil Th2, podendo nos pacientes do estudo, estar dando início à uma expansão para a produção de citocinas Th2 de caráter mais supressor⁶⁷.

Com esses resultados, foi possível observar que entre todas as citocinas e populações celulares avaliadas, CXCL9 é a quimiocina que se apresenta consistentemente em concentrações aumentadas no plasma de pacientes respondedores, e inclusive tem um aumento depois do início do tratamento neste grupo. Visando um biomarcador que possa prever resposta desde o início do tratamento, a fim de evitar a submissão de um paciente a um tratamento tal que pode não responder, CXCL9 se demonstrou um bom candidato. Foram feitas análises de regressões logísticas para esse quimiocina, além de testes para medir sua acurácia como possível biomarcador, e foi possível concluir que ela possui alta sensibilidade e especificidade para prever resposta, além de ser possível afirmar que a cada 1 pg/ml de aumento de CXCL9 nos pacientes, a chance de resposta aumenta em 3%.

7 CONCLUSÃO

A partir dos nossos resultados, podemos concluir que o perfil imune sistêmico antes e logo após início de tratamento com *check point inhibitors* dos pacientes respondedores é mais pró-inflamatório, com maior frequência de linfócitos T CD8+, e maiores concentrações de IFN- γ (em tempo 1) e CXCL9 (em tempo 0 e 1), por exemplo, além de uma correção sistêmica de monócitos com citocinas inflamatórias e células T CD8+, enquanto os não respondedores não mostram estas correlações. Como biomarcador é possível destacar CXCL9, que teve valores aumentados desde antes do início do tratamento, aumentando ainda mais após o início do tratamento dos pacientes respondedores, possuindo alta sensibilidade e especificidade como um importante biomarcador preditor de resposta à imunoterapia.

8 REFERÊNCIAS

1. National Cancer Institute-NCI. What is cancer? Updated: February 9, 2015. Disponível em: <https://bit.ly/3hZFKdM>. [2020 jun 15]
2. World Health Organization-WHO. Cancer today. Lyon: International Agency for Research on Cancer-IARC; 2018. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home>. [2020 jan 12]
3. World Health Organization-WHO. Cancer. 12 September 2018. Disponível em: <https://bit.ly/32S3WKW>. [2020 mai 15]
4. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimate/2018-incidence de cancer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA: 2017.
5. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(6):345–58.
6. Lo JA, Fisher DE. The melanoma revolution: From UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Sciences*. 2014;346(6212):945–9.
7. Halaban R. The regulation of normal melanocyte proliferation. *Pigment Cell Res*. 2000;13(1):4–14.
8. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet*. 2003;33(1):19–20.
9. Tucker MA, Halpern A, Holly EA, Hartge P, Sagebiel RW, Iv DG, et al. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA*. 1997;277(18):1439-44.
10. Higgins HW, Lee KC, Galan A, Leffell DJ. Melanoma in situ: Part I. Epidemiology, screening, and clinical features. *J Am Acad Dermatol*. 2015;73(2):181–90.
11. Higgins HW, Lee KC, Galan A, Leffell DJ. Melanoma in situ: Part II. Histopathology, treatment, and clinical management. *J Am Acad Dermatol*. 2015;73(2):193–203.
12. Park AJ, Paul J, Chapman MS, Samie FH. Long-term outcomes of melanoma in situ treated with topical 5% imiquimod cream: a retrospective review. *Dermatologic Surg*. 2017;43(8):1017–22.
13. Wick MR, Gru AA. Metastatic melanoma: Pathologic characterization, current treatment, and complications of therapy. *Semin Diagn Pathol*. 2016;33(4):204–18.
14. Westphal D, Glitza Oliva IC, Niessner H. Molecular insights into melanoma brain metastases. *Cancer*. 2017;123(s11):2163–75.

15. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009;27(36):6199–206.
16. Chapman BPB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Destro AN, Panageas KS, et al. Phase III multicenter randomized trial of the dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2019;17(9):2745–51.
17. Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol.* 1999;17(7):2105–2105.
18. Ko JS. The immunology of melanoma. *Clin Lab Med.* 2017;37(3):449–71.
19. Ehrlich P. Ueber den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk.* 1909;5:273–90.
20. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol.* 1997;15(1):749–95.
21. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2002;20(1):323–70.
22. Street SEA, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon- γ activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood.* 2001;97(1):192–7.
23. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to Cancer. *Annu Rev Immunol.* 2011;29(1):235–71.
24. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature.* 2007;450(7171):903–7.
25. Loren AW, Desai S, Gorman RC, Schuchter LM. Retransplantation of a cardiac allograft inadvertently harvested from a donor with metastatic melanoma. *Transplantation.* 2003;76(4):741–3.
26. Kim JK, Carmody IC, Cohen AJ, Loss GE. Donor transmission of malignant melanoma to a liver graft recipient: Case report and literature review. *Clin Transplant.* 2009;23(4):571–4.
27. Milton CA, Barbara J, Cooper J, Rao M, Russell C, Russ G. The transmission of donor-derived malignant melanoma to a renal allograft recipient. *Clin Transplant.* 2006;20(5):547–50.
28. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin*

- Immunol. 2014;27(1):16–25.
29. Komohara Y, Fujiwara Y, Ohnishi K, Takeya M. Tumor-associated macrophages: Potential therapeutic targets for anti-cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;99:180–5.
 30. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology.* 2014;27:16-25. *Curr Opin Immunol.* 2014;27:16–25.
 31. Thompson CB, Allison JP. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity.* 1997;7(4):445–50.
 32. Chamoto K, Al-Habsi M, Honjo T. Role of PD-1 in Immunity and Diseases. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017;410:75-97.
 33. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science.* 2018;359(6382):1350–5.
 34. Homet Moreno B, Ribas A. Anti-programmed cell death protein-1/ligand-1 therapy in different cancers. *Br J Cancer.* 2015;112(9):1421–7.
 35. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(19):12293–7.
 36. Van Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied. *J Exp Med.* 1999;190(3):355–66.
 37. Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(8):711–23.
 38. Dummer R, Daud A, Puzanov I, Hamid O, Schadendorf D, Robert C, et al. A randomized controlled comparison of pembrolizumab and chemotherapy in patients with ipilimumab-refractory melanoma. *J Transl Med.* 2015;13(Suppl 1):O5.
 39. Robert C, Long G V., Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* 2015;372(4):320–30.
 40. Houser B. Bio-rad’s Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview. *Arch Physiol Biochem.* 2012;118(4):192–6.

41. Herzberg B, Fisher DE. Metastatic melanoma and immunotherapy. *Clin Immunol.* 2016;172(3):105–10.
42. Chow MT, Ozga AJ, Servis RL, Frederick DT, Lo JA, Fisher DE, et al. Intratumoral activity of the CXCR3 chemokine system is required for the efficacy of anti-PD-1 therapy. *Immunity.* 2019;50(6):1498-1512.e5.
43. Humblin E, Kamphorst AO. CXCR3-CXCL9: It's all in the tumor. *Immunity.* 2019;50(6):1347–9.
44. House IG, Savas P, Lai J, Chen AXY, Oliver AJ, Teo ZL, et al. Macrophage derived CXCL9 and CXCL10 are required for anti-tumor immune responses following immune checkpoint blockade. *Clin Cancer Res.* 2020;26(2):487-504.
45. Bharat A, McQuattie-Pimentel AC, Budinger GRS. Non-classical monocytes in tissue injury and cancer. *Oncotarget.* 2017;8(63):106171–2.
46. Romano E, Kusio-Kobialka M, Foukas PG, Baumgaertner P, Meyer C, Ballabeni P, et al. Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(19):6140–5.
47. Nascimbeni M, Pol S, Saunier B. Distinct CD4+CD8+ double-positive T cells in the blood and liver of patients during chronic hepatitis B and C. *PLoS One.* 2011;6(5):2–9.
48. Dengel LT, Norrod AG, Gregory BL, Clancy-Thompson E, Burdick MD, Strieter RM, et al. Interferons induce CXCR3-cognate chemokine production by human metastatic melanoma. *J Immunother.* 2010;33(9):965–74.
49. Zhang Z, Young K, Zhang L. CD3+CD4-CD8- $\alpha\beta$ -TCR+ T cell as immune regulatory cell. *J Mol Med.* 2001;79(8):419–27.
50. Aliper AM, Frieden-Korovkina VP, Buzdin A, Roumiantsev SA, Zhavoronkov A. A role for G-CSF and GM-CSF in nonmyeloid cancers. *Cancer Med.* 2014;3(4):737–46.
51. Eberle J. Countering TRAIL resistance in melanoma. *Cancers (Basel).* 2019;11(5).
52. Nenu I, Tudor D, Filip AG, Baldea I. Current position of TNF- α in melanomagenesis. *Tumor Biol.* 2015;36(9):6589–602.
53. Tugues S, Burkhard SH, Ohs I, Vrohling M, Nussbaum K, Vom Berg J, et al. New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death Differ.* 2015;22(2):237–46.
54. Zhang L, Morgan RA, Beane JD, Zheng Z, Dudley ME, Kassim SH, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2015;21(10):2278–88.

55. Liu Y, Cai Y, Liu L, Wu Y, Xiong X. Crucial biological functions of CCL7 in cancer. *PeerJ*. 2018;2018(6):1–21.
56. Wetzel K, Struyf S, Van Damme J, Kayser T, Vecchi A, Sozzani S, et al. MCP-3 (CCL7) delivered by parvovirus MVMP reduces tumorigenicity of mouse melanoma cells through activation of T lymphocytes and NK cells. *Int J Cancer*. 2007;120(6):1364–71.
57. Maier LM, Anderson DE, Severson CA, Baecher-Allan C, Healy B, Liu D V, et al. Soluble IL-2RA Levels in Multiple Sclerosis Subjects and the Effect of Soluble IL-2RA on Immune Responses. *J Immunol*. 2009;182(3):1541–7.
58. Rubin LA, Nelson DL. The soluble interleukin-2 receptor: Biology, function, and clinical application. *Ann Intern Med*. 1990;113(8):619–27.
59. Garg K, Maurer M, Griss J, Brüggemann MC, Wolf IH, Wagner C, et al. Tumor-associated B cells in cutaneous primary melanoma and improved clinical outcome. *Hum Pathol*. 2016;54:157–64.
60. Ladányi A, Kiss J, Mohos A, Somlai B, Liskay G, Gilde K, et al. Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(12):1729–38.
61. Da Gama Duarte J, Peyper JM, Blackburn JM. B cells and antibody production in melanoma. *Mamm Genome*. 2018;29(11–12):790–805.
62. Cristiani CM, Garofalo C, Passacatini LC, Carbone E. New avenues for melanoma immunotherapy: Natural Killer cells? *Scand J Immunol*. 2020;91(4):1–13.
63. Ziani L, Safta-Saadoun T Ben, Gourbeix J, Cavalcanti A, Robert C, Favre G, et al. Melanoma-associated fibroblasts decrease tumor cell susceptibility to NK cell-mediated killing through matrix-metalloproteinases secretion. *Oncotarget*. 2017;8(12):19780–94.
64. Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingluff C, et al. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8⁺ T-cell recruitment. *Cancer Res*. 2009;69(7):3077–85.
65. Bjoern J, Juul Nitschke N, Zeeberg Iversen T, Schmidt H, Fode K, Svane IM. Immunological correlates of treatment and response in stage IV malignant melanoma patients treated with Ipilimumab. *Oncoimmunology*. 2016;5(4):1–10.
66. Yamazaki N, Kiyohara Y, Uhara H, Iizuka H, Uehara J, Otsuka F, et al. Cytokine biomarkers to predict antitumor responses to nivolumab suggested in a phase 2 study for advanced melanoma. *Cancer Sci*. 2017;108(5):1022–31.
67. Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol*. 2010;11(3):197–206.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

São Paulo, 29 de agosto de 2018.

Ao
Dr. Kenneth John Gollob
Aluna: Iasmim Polido Santos (Mestrado)

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2463/17C

"Caracterização do perfil imune celular e solúvel de pacientes com melanoma metastático respondedores ou não à imunoterapia com anti-PD1."

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **21/08/2018 tomaram conhecimento e aprovaram** o seguinte documento:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático *"Um estudo prospectivo para elucidar redes imunorreguladoras sistêmicas e microambientes tumorais relacionadas à falência do tratamento com pembrolizumab em pacientes com melanoma em estágio IV e NSCLC."*, registrado neste CEP sob nº 2463/17. O projeto afiliado em referência será Mestrado da aluna Iasmim Polido Santos, sob orientação do Dr. Kenneth John Gollob.

Atenciosamente,


Dra. Sandra Cajés Serrano
2ª. Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

Nome do Participante da Pesquisa:
Número de Identificação do Participante da Pesquisa no Hospital:
RGH:
Telefone do participante da pesquisa:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Estudo: “Um estudo prospectivo para elucidar redes imunorreguladoras sistêmicas e microambientes tumorais relacionados à falência do tratamento sistêmico em pacientes com melanoma ou NSCLC (câncer de pulmão de células não pequenas)”.

Nome do Investigador principal: Dr. Kenneth J. Gollob

Endereço da Instituição: Rua Professor Antonio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo/SP.

Número de Telefone: 11 2189-5138

Este termo de consentimento livre e esclarecido lhe fornece informações importantes sobre o estudo clínico não intervencionista (sem uso de medicamento) para o qual você está sendo convidado a participar. Este estudo irá coletar informações relacionadas a você e seu diagnóstico e usará parte do material (tecido) obtido da sua biópsia, além de prever a coleta de uma amostra de sangue. Se algum outro fluido corpóreo (líquido coletado do seu corpo) vier a ser coletado como parte de sua investigação ou tratamento também separaremos uma amostra para análises dentro do estudo. Por favor, leia estas informações cuidadosamente antes de decidir participar neste estudo. Ninguém pode forçá-lo a participar e você pode se retirar do estudo a qualquer momento.

Se você optar por participar deste estudo, será solicitado que você assine e date este termo de consentimento em duas vias. Você receberá uma via assinada e datada e a outra via será mantida nos arquivos do estudo.

As seções seguintes descrevem o estudo clínico. Antes de você decidir participar deste estudo, por favor, leve o tempo que você precisar para fazer perguntas ao médico do estudo ou equipe do centro, bem como sua família e amigos, ou com o seu médico pessoal ou outro profissional da saúde. O médico do estudo e/ou a equipe do centro irá responder plenamente qualquer pergunta que você tenha antes de você tomar decisão de participar ou não deste estudo clínico.

1. QUAL A FINALIDADE DESTE ESTUDO?

Você está sendo convidado a participar deste estudo clínico porque você está sendo investigado para uma suspeita de diagnóstico de um tumor de pulmão ou de pele. Alternativamente, você pode estar sendo convidado a participar deste estudo por ser um indivíduo saudável, sem diagnóstico de qualquer tipo de tumor. Caso faça parte do grupo de indivíduos saudáveis, será feita apenas a coleta de uma amostra de sangue, em um único momento.

Este estudo tem a finalidade de entender melhor o papel do sistema imune (sistema de defesa do corpo) em resposta ao tratamento que você receberá, utilizando análise genética (análise do DNA das células) através da técnica de sequenciamento (análise das alterações no DNA de todas as células de seu tumor) e análise imunológica celular (células relacionadas com a defesa do organismo contra o câncer) nas amostras de tecido, fluídos e sangue.

Por ser um estudo não intervencionista (ou seja, sem o uso de medicamentos experimentais), você será tratado por seu médico pessoal independentemente de sua participação ou não neste estudo clínico.

Neste estudo pretendemos entender porque algumas pessoas com diagnóstico de câncer de pulmão de células não pequenas e melanoma respondem bem e outras não respondem ao tratamento, assim esperamos desenvolver novos tratamentos e diagnósticos para ajudar no tratamento futuro de câncer.

Os biomarcadores são substâncias que estão presentes em células anormais de certos tipos de doenças. Ao analisar uma amostra de seu tecido, fluído ou sangue para esses biomarcadores, os médicos do estudo poderão saber se estas substâncias estão presentes no seu organismo e poderá orientar sobre a melhor opção de tratamento específico.

Caso tenhamos ao final do estudo uma conclusão positiva das análises teremos disponível um teste de diagnóstico eficiente, mais preciso, que irá beneficiar um número maior de pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas ou melanoma em todo mundo.

Ao assinar este termo de consentimento você estará concordando que suas amostras (tecido, fluido e sangue) sejam usadas como parte deste estudo.

2. QUANTAS PESSOAS PARTICIPARÃO NESTE ESTUDO E QUAL SERÁ SUA DURAÇÃO?

Esperam-se que no mínimo 180 pessoas participem neste estudo, realizado em A. C. Camargo Cancer Center.

Este estudo será desenvolvido ao longo de três anos.

3. POR QUANTO TEMPO PARTICIPAREI NO ESTUDO?

Estima-se que sua participação neste estudo terá duração de aproximadamente 24 meses.

4. O QUE ACONTECERÁ DURANTE O ESTUDO?

O estudo das células é realizado com um fragmento do tecido coletado através de uma cirurgia ou biópsia que seu médico precisa fazer para diagnosticar sua doença e através da coleta de amostras de sangue. Fluidos corpóreos (líquidos que são retirados de seu pulmão, de seu abdômen, de sua coluna ou outro órgão), que venham a ser coletados através de algum procedimento já programado pelo seu médico assistente como parte de sua investigação ou tratamento também podem ter uma pequena quantidade deste material guardada para este estudo. Este fluido corpóreo só será coletado se houver necessidade de algum procedimento solicitado pelo seu médico, não será necessário realizar nenhum procedimento adicional para esta coleta. As amostras coletadas serão armazenadas em um laboratório de análise patológica (que analisa as doenças) integrante do hospital.

Caso você aceite participar deste estudo será solicitado que você:

- Assine este termo de consentimento livre e esclarecido;
- Complete o formulário de caso clínico com seus dados, tais como data de nascimento, sexo, raça, peso, altura;
- Autorize a utilização de parte de sua biópsia de pulmão ou pele (melanoma), no caso dos pacientes que realizarão a biópsia;

- Autorize a utilização de fluidos corpóreos caso você seja submetido a algum procedimento que realizará esta coleta, lembrando que não haverá necessidade de realizar nenhum procedimento adicional para esta coleta do estudo;
- Concorde em coletar amostras de sangue, consistindo em dois tubos de sangue de 4 mL cada. Essas amostras serão analisadas em laboratório específico.

Após a realização da biópsia, se o seu diagnóstico não for câncer de pulmão de não pequenas células ou melanoma, não realizaremos novas coletas de sangue.

Visita do estudo

Ao assinar o termo de consentimento as atividades serão iniciadas. Coletaremos um fragmento da biópsia e uma amostra de sangue antes de qualquer tratamento. Após seu diagnóstico e definição do seu tratamento, se porventura você for tiver o diagnóstico de câncer de pulmão não pequenas células ou melanoma e você vier a receber algum tipo de quimioterapia ou imunoterapia, coletaremos sangue nos seguintes momentos: três (3), nove (9), vinte e sete (27) e quarenta e cinco (45) semanas após o início do tratamento. Além disso, e apenas para o grupo de pacientes com melanoma localmente avançado submetidos à imunoterapia, poderá ser realizada uma coleta adicional seis (6) semanas após o início do tratamento, desde que solicitada pelo médico responsável. A coleta de fluidos corpóreos só será realizada caso você seja submetido a algum procedimento que já realizará esta coleta, dentro do período que você estará participando do estudo.

Você não terá necessidade de comparecer ao hospital para realizar qualquer procedimento específico do estudo. Aproveitaremos seus atendimentos para realizar as coletas descritas acima.

A coleta de sangue dos indivíduos saudáveis será feita nas dependências do ACCCC, em dia e horário previamente combinados.

Em decorrência da coleta de sangue da veia do seu braço você pode apresentar:

- Dor no local da coleta do sangue (quando da coleta com agulha);
- Mancha roxa no local da coleta do sangue (onde a agulha foi inserida);
- Tonturas;
- Infecção no local da coleta do sangue.

Se você sofrer qualquer lesão, dano ou tornar-se incapaz de alguma forma, devido à sua participação neste estudo clínico você receberá atendimento médico, embora não espere tal

nível de complicação uma vez que não haverá nenhuma intervenção médica além daquela prescrita por seu médico para seu tratamento.

Armazenamento da amostra:

Todos os seus dados serão mantidos em absoluto sigilo (não serão revelados a ninguém). Sua amostra de tecido, fluido corpóreo (se coletado) e seu sangue serão identificados por um número composto por 8 dígitos, não contendo seu nome ou alguma informação que possa lhe identificar.

Suas amostras serão analisadas pelos laboratórios de pesquisa que participarão neste estudo clínico. Todas as partes irão garantir que a confidencialidade dos seus dados seja mantida.

A ACCCC vai tomar as medidas adequadas para proteger a segurança de todas as amostras.

A ACCCC também irá proteger a confidencialidade de todas as informações relativas às amostras que podem identificá-lo.

5. QUAIS OS POSSÍVEIS BENEFÍCIOS DE PARTICIPAR NESTE ESTUDO?

Não haverá nenhum benefício direto a você pela sua participação neste estudo, e você receberá o seu atendimento médico e tratamento conforme orientação do seu médico pessoal, sem nenhuma modificação em função dos resultados obtidos pelas análises previstas neste estudo.

No caso dos indivíduos saudáveis, todos os dados obtidos com a análise das amostras de sangue e os dados obtidos por meio de questionários serão utilizados para comparar com os dados dos outros participantes deste estudo (pacientes com tumor de pulmão ou tumor de pele).

Os resultados obtidos neste estudo poderão ajudar outras pessoas com câncer de pulmão de células não pequenas ou melanoma no futuro.

6. MINHA PARTICIPAÇÃO É VOLUNTÁRIA?

Sim. Sua participação neste estudo é totalmente voluntária.

Você pode optar por não participar deste estudo ou você pode mudar de ideia a qualquer momento, e retirar seu consentimento (ou seja, você não mais autoriza a análise das suas amostras). Não haverá nenhuma penalidade a você caso seja do seu desejo retirar seu

consentimento. Você não perderá nenhum dos seus direitos e benefícios que atualmente recebe ou que tenha o direito de receber.

Sua decisão não afetará o acesso aos cuidados médicos no futuro.

Você pode solicitar a destruição de suas amostras, fazendo um pedido para o pesquisador responsável pelo estudo ou pessoas autorizadas. No entanto, todos os dados já gerados a partir de suas amostras serão mantidos para preservar a validação deste estudo.

Se você retirar seu consentimento sua participação no estudo será finalizada e a equipe do estudo suspenderá a coleta de suas informações. Além disso, a equipe do estudo irá parar de usar suas informações e interromperá a divulgação das mesmas exceto aquelas informações que foram obtidas anteriormente à sua decisão de retirar seu consentimento.

7. EU TEREI ALGUM CUSTO AO PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Sua participação neste estudo é voluntária e não terá nenhum custo a você.

Por ser um estudo não intervencionista (ou seja, sem o uso de medicamentos experimentais), apenas serão coletadas informações clínicas, amostras de sangue e de tecido tumoral.

Não haverá alteração em seu tratamento médico com seu médico pessoal, independentemente de sua participação ou não neste estudo clínico.

8. EU SEREI PAGO PARA PARTICIPAR NESTE ESTUDO (RESSARCIMENTO)?

Você não receberá nenhum pagamento pela sua participação neste estudo. Todos os procedimentos do estudo serão realizados durante as visitas que você de fazer ao hospital devido ao seu tratamento.

9. COMO A MINHA PRIVACIDADE SERÁ PROTEGIDA?

A privacidade de seus dados será mantida.

Todas as informações obtidas neste estudo serão mantidas confidenciais de acordo com as normas e regulamentações brasileiras.

Todos os seus dados serão mantidos em absoluto sigilo (não serão revelados a ninguém a não aos pesquisadores diretamente envolvidos na coleta de dados clínicos).

Suas amostras serão analisadas pelo laboratório do ACCCC que participará neste estudo clínico e irá garantir que a confidencialidade dos seus dados seja mantida.

Os resultados deste estudo clínico podem ser publicados com fins científicos e jamais irão mencionar a sua identidade.

As informações obtidas durante a sua participação neste estudo clínico, bem como informações relacionadas à sua saúde, serão estritamente confidenciais em todos os momentos.

10. ONDE POSSO ENCONTRAR INFORMAÇÕES ADICIONAIS SOBRE ESTE ESTUDO OU SEUS RESULTADOS?

Você pode pedir as informações referentes ao estudo ao médico do estudo e sua equipe a qualquer momento e ter acesso aos dados que estão disponíveis publicamente.

11. COM QUEM POSSO FAZER CONTATO PARA ESCLARECER DÚVIDAS SOBRE OS MEUS DIREITOS E PERGUNTAS?

Antes de assinar este termo de consentimento você deve esclarecer todas as suas dúvidas.

A equipe do estudo responderá às suas perguntas antes, durante e após o estudo. Se você achar que a sua pergunta não foi totalmente respondida ou não entendeu a resposta, por favor, continue perguntando até que suas dúvidas tenham sido plenamente esclarecidas.

Se você tiver alguma dúvida ou reclamação sobre este estudo ou como está sendo realizado, por favor, sinta-se livre para discutir suas preocupações com a equipe de estudo. Os números de telefone para entrar em contato com a equipe de estudo aparecem na primeira página deste termo de consentimento.

Se você não se sentir confortável para discutir suas reclamações éticas com a equipe de estudo, entre em contato com o Comitê de Ética listado abaixo.

Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente – AC Camargo Câncer Center:

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, São Paulo – SP, CEP 01509-900

Telefone para contato: (11) 2189-5020.

Horário de atendimento: de segunda-feira a quinta-feira das 08:00 às 18:00 e a sexta-feira das 08:00 às 16:00.

12. DISPONIBILIDADE DA AMOSTRA RESTANTE

Você tem a opção de disponibilizar o restante de seu material biológico (todo material coletado de seu corpo, exemplo: sangue, tecido e líquidos), que seria desprezado, ao biobanco do A.C.Camargo Cancer Center para estudos futuros que podem levar a novos achados científicos para ajudar na luta contra o câncer.

Marque a opção desejada:

1. () Autorizo que o material biológico seja disponibilizado ao biobanco do A. C. Camargo Cancer Center e que seja guardado e usado pelo A C Camargo Cancer Center para pesquisas sobre a prevenção, tratamento, diagnóstico ou cura do câncer e doenças relacionadas, bem como dados de idade, sexo, fatores epidemiológicos relacionados, outras informações do meu prontuário médico, diagnóstico, tratamento e história familiar.
2. () Não autorizo que o material biológico seja disponibilizado ao biobanco do A. C. Camargo Cancer Center ou que seja guardado e usado pelo do A. C. Camargo Cancer Center, para pesquisas sobre a prevenção, tratamento, diagnóstico ou cura do câncer e doenças relacionadas, bem como dados de idade, sexo, fatores epidemiológicos relacionados, outras informações do meu prontuário médico, diagnóstico, tratamento e história familiar.

Se você escolheu a **resposta 1**, por favor escolha uma das opções a seguir:

3. () Autorizo o uso do meu material biológico em pesquisas sobre o câncer e doenças relacionadas, sem a necessidade de ser contatado para fornecer novas autorizações.
4. () Autorizo o uso do meu material biológico em pesquisas sobre o câncer e doenças relacionadas desde que eu seja contatado para saber sobre a pesquisa e fornecer ou não a autorização.

Por fim, você será comunicado no caso de perda, destruição ou término de suas amostras biológicas ou ainda sobre a transferência desse material para outro local.

Se você escolheu a **resposta 4**, queira por gentileza colocar o seu contato e de uma pessoa de seu convívio e confiança, que possa exercer as atividades supra mencionadas:

Nome do doador do material biológico:

Telefone: _ () _____

Nome da pessoa de sua confiança:

Telefone: _ () _____

13. ASSINATURAS

Eu li e entendi as informações contidas neste termo de consentimento livre e esclarecido.

Eu tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas para minha satisfação. Tive tempo suficiente e a oportunidade para perguntar sobre os detalhes do estudo e decidir se quero ou não participar do estudo. Eu voluntariamente concordo em participar deste estudo e não desisto de qualquer um dos meus direitos legais ao assinar este termo de consentimento.

Eu sei que receberei uma via deste termo de consentimento e que a outra via ficará retida com o pesquisador responsável pelo estudo. Esse termo de consentimento foi elaborado em duas vias que foram assinadas, rubricadas e datadas por mim e pelo pesquisador responsável do estudo.

Participante da pesquisa

Nome	Assinatura	Data
Rubrica do participante:		

Pesquisador responsável ou pessoa delegada:

As informações contidas neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram lidas para o participante do estudo ou seu/sua representante legal. Creio que essa pessoa tenha tido o tempo necessário para compreender o que foi lido e explicado para ele/ela e consentido em participar do estudo de sua própria vontade. Declaro que eu vou seguir a resolução 466/2012 itens IV.3 e IV.4

Nome	Assinatura	Data
Rubrica:		

REPRESENTANTE LEGAL DO PARTICIPANTE (SE APLICÁVEL)

Relação com o participante. _____

Nome	Assinatura	Data
Rubrica:		

TESTEMUNHA IMPARCIAL – SE APLICÁVEL (ISTO É: NO CASO DE O PARTICIPANTE/REPRESENTANTE LEGAL SER CEGO OU ANALFABETO):

Nome	Assinatura	Data
Rubrica:		

OBSERVAÇÃO: Cada pessoa que assinar este termo de consentimento deve rubricar e datar pessoalmente sua assinatura.

* A hora é necessária só se a informação é fornecida e o consentimento são entregues no mesmo dia, ou se o consentimento foi entregue e no mesmo dia se realizou uma atividade específica do estudo.