

**ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL IMUNE NO
SANGUE DE PACIENTES METÁSTÁTICOS E NÃO
METASTÁTICOS COM CÂNCER DE PULMÃO DE
NÃO PEQUENAS CÉLULAS**

STÉPHANIE MARTINEZ IASBEKE FERREIRA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente, para
obtenção do 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 pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

F383 Ferreira, Stéphanie Martinez Iasbeke
Análise comparativa do perfil imune no sangue de pacientes metastáticos e não metastáticos com câncer de pulmão de não pequenas células / Stéphanie Martinez Iasbeke Ferreira - São Paulo, 2020.
51p.
Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.
Orientador: Kenneth John Gollab

Descritores. Carcinoma de Pequenas Células do Pulmão/Small Cell Lung Carcinoma. 2. Microambiente tumoral/Tumor Microenvironment. 3. Metástase Neoplásica/Neoplasm Metastasis. 4. Prognóstico/Prognosis. 5. Biomarcadores Tumoriais/Biomarkers, Tumor

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.

RESUMO

Ferreira SMI. **Análise comparativa do perfil imune no sangue de pacientes metastáticos e não metastáticos com câncer de pulmão de não pequenas células.** [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2020.

Câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC) é o tipo mais frequente de câncer de pulmão, acometendo por volta de 85% à 90% de todos os cânceres de pulmão, sendo o tabagismo o fator de risco mais relevante para a doença. O sistema imune possui um papel importante na resposta antitumoral, porém, as células do tumor fazem uso de mecanismos para evadir da imunovigilância através de células imunossupressoras e produção de citocinas. A análise de células imunes e de citocinas pode auxiliar em um conhecimento mais abrangente do microambiente tumoral como um todo, permitindo um melhor entendimento da doença e a proposta de tratamentos que possam ser mais eficazes. Neste trabalho, foi avaliando o perfil imune sistêmico de pacientes com CPNPC, comparando pacientes não metastáticos (estágios I, II, III) e pacientes metastáticos (estágio IV). Nós avaliamos a frequência de células linfoides e mieloides por meio de citometria de fluxo, além das concentrações plasmáticas de citocinas por meio da análise multiplex a partir de amostras de sangue de pacientes coletadas antes do início do tratamento. Foram incluídos 39 pacientes com CPNPC, sendo 28 no grupo de metastáticos e 11 no grupo de não metastáticos. Foi possível verificar um aumento da frequência de monócitos inflamatórios no sangue de pacientes metastáticos, se comparados a pacientes não metastáticos, indicando um microambiente mais favorável ao desenvolvimento de metástase. Além disso, foram observados níveis mais elevados de monócitos não-clássicos, conhecidos como patrulhadores e das citocinas TRAIL E IL-1Ra em pacientes não metastáticos, indicando um microambiente mais protetor. Concluindo, este estudo propõe mecanismos imunológicos relacionados ao desenvolvimento de metástase para pacientes com CPNPC, sugerindo biomarcadores que podem auxiliar no prognóstico e acompanhamento desse grupo de pacientes.

Descritores: Carcinoma de Pequenas Células do Pulmão. Microambiente tumoral. Metástase Neoplásica. Prognóstico. Biomarcadores Tumorais.

ABSTRACT

Ferreira SMI. [Comparative analysis of the immune profile in blood of patients with non small cell lung cancer]. [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2020.

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most common type of cancer among lung cancers, accounting for about 85% to 90% of cases, with smoking being the most relevant risk factor related to the disease. The immune system plays an important role in anti-tumoral response; however, tumor cells use mechanisms that allow escape from immune surveillance, such as the presence of immunosuppressive cells and production of inhibitory cytokines in the tumor microenvironment. Analyzing the immune cells and cytokines can be helpful to better understand the tumor microenvironment and diseases development allowing a more effective treatment. In this work it was determine the immune cells profile of patients with NSCLC, comparing non-metastatic (stages I, II and III) and metastatic (stage IV) patients. We evaluated the frequencies of lymphocytes and myeloid cells in patients using flow cytometry and plasmatic cytokines concentration cytokines using multiplex analysis in blood samples collected before treatment begins. It was including 39 NSCLC patients, of which 28 from the metastatic group and 11 from the non-metastatic group. There was an increase in inflammatory monocytes frequency in metastatic patients when compared to metastatic patients indicating a more favorable microenvironment for tumor metastasis. Moreover, it was found discovered a higher level of non-classic monocytes also known as patrolling monocytes, and TRAIL and IL-1Ra Cytokines in non-metastatic patients in compare with metastatic patients, indicating a more protective microenvironment. In conclusion, this study demonstrated immunological mechanisms related to metastasis in NSCLC patient suggesting helpful biomarker for prognosis and patient flow up.

Keywords: Small Cell Lung Carcinoma. Tumor Microenvironment. Neoplasm Metastasis. Prognosis. Biomarkers, Tumor.

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1	Distribuição de tipos de câncer mais frequentes por sexo estimados para 2018.....	2
Figura 2	Ilustração com os dez fatos relacionados à carcinogênese	5
Figura 3	Ilustração com estratégia de gates utilizados para identificação de células linfocitárias e mieloides através do software Flow Jo	17
Figura 4	Identificação de populações linfocitárias características de pacientes com doença metastática ou não metastática.....	23
Figura 5	Identificação de populações de origem mieloide características de pacientes com doença metastática ou não metastática.....	24
Figura 6	Frequência de linfócitos T no sangue periférico de pacientes não metastáticos e metastáticos	25
Figura 7	Frequência de marcadores de ativação e exaustão em linfócito T CD4 e T CD8 no sangue periférico de pacientes não metastáticos e metastáticos.....	26
Figura 8	Frequência de células natural killer no sangue periférico de pacientes não metastáticos e metastáticos	27
Figura 9	Frequência de células NKT CD4 e NKT CD8 no sangue periférico de pacientes não metastáticos e metastáticos.....	28
Figura 10	Frequência de linfócitos B e plasmócitos no sangue periférico de pacientes não metastáticos e metastáticos	29
Figura 11	Comparação de frequência de monócitos em sangue periférico entre grupos de pacientes não metastáticos e metastáticos por citometria de fluxo	30

Figura 12	Frequência de marcadores de exaustão PD-L1 e PD-L2 sobre subtipos de monócitos no sangue periférico de pacientes não metastáticos e metastáticos	31
Figura 13	Concentração de citocinas no plasma de pacientes com doença metastática ou não metastática.....	32
Figura 14	Concentração de citocinas no plasma e comparação entre os pacientes não metastáticos e metastáticos	32
Figura 15	Correlação entre as citocinas TRAIL e IFN- α com as populações imunes de interesse.....	34
Figura 16	Correlação entre a citocina MCP-3 com as populações imunes de interesse	35
Figura 17	Correlação da citocina IL-16 com as populações imunes de interesse e citocina.....	36
Figura 18	Mecanismos imunes associados ao desenvolvimento de metástase em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células	43
Tabela 1	Tabela de caracterização dos grupos de pacientes estudados	20

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APCs	células apresentadoras de antígeno
CPNPC	câncer de pulmão de não pequenas células
CTLA-4	antígeno 4 do linfócito T citotóxico
DC	células dendríticas
Fig.	Figura
IL	interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INF	interferon
MCP-1	do inglês <i>monocytes chemoattractant protein 1</i>
MCP-3	do inglês <i>monocytes chemoattractant protein 3</i>
MyD88	do inglês, <i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
PBS	tampão fosfato-salino
SFB	soro fetal bovino
TGF-β	fator de transformação do crescimento β
Th	linfócitos T auxiliares, ou do inglês, <i>T helper</i>
TNF-α	fator de necrose tumoral α
TRAIL	do inglês <i>The tumor necrosis factor (TNF) related apoptosis inducing ligand</i>
Treg	células T reguladoras
mg	miligramas
kg	quilogramas
μg	microgramas
μL	microlitros
mL	mililitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer.....	1
1.2	Câncer de pulmão e incidência no Brasil.....	1
1.3	Formação do Câncer e Microambiente Tumoral.....	4
1.4	Metástase Tumoral.....	12
2	JUSTIFICATIVA.....	13
3	OBJETIVOS.....	14
3.1	Objetivo Geral.....	14
3.2	Objetivos Específicos.....	14
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1	Pacientes.....	15
4.2	Coleta de sangue periférico.....	15
4.3	Coleta e armazenamento de plasma.....	15
4.4	Citometria de fluxo.....	16
4.5	Estratégias de análises para citometria de fluxo.....	16
4.6	Ensaio multiplex para analitos solúveis.....	17
4.7	Análises Estatísticas.....	18
5	RESULTADOS.....	19
5.1	Caracterização da população dos pacientes estudados.....	19
5.2	Identificação de populações celulares diferencialmente presentes nos dois grupos de pacientes.....	21
5.3	Caracterização de populações celulares imunes no sangue periférico de pacientes metastáticos e não metastáticos.....	24
5.4	Quantificação de citocinas e quimiocinas.....	31
5.5	Associação entre perfil imune e perfil celular.....	33

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

1.1 CÂNCER

O câncer é uma doença que ocorre a partir de um estado de desregulação celular, levando à proliferação descontrolada e perda de capacidade de apoptose das células do nosso organismo. Estas células, outrora normais, se tornam "modificadas" a partir da ativação e expressão de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais ¹.


No Brasil, apenas para o biênio de 2018-2019, o Instituto Nacional do Câncer estimou aproximadamente 580.000 novos casos e 197.000 mortes devidos às neoplasias. Essas estimativas dizem respeito principalmente a cânceres de pulmão, próstata, mama e cólon e reto, que tendem a ser os mais frequentes no país ².

O câncer de pulmão costuma ser um dos mais frequentes em todo o mundo. Assim, maiores estudos relacionados a ele são necessários e podem ajudar a diminuir a incidência desses casos no mundo.

1.2 CÂNCER DE PULMÃO E INCIDÊNCIA NO BRASIL

Segundo dados do INCA, o câncer de traqueia, brônquios e pulmão é o segundo tipo mais frequente entre homens brasileiros, chegando a 18.740 novos casos, e o quarto tipo mais frequente entre mulheres, chegando a 12.530 novos casos para cada ano do biênio 2018-2019. Esse grande número de pacientes no país é alarmante e necessita de maior atenção para conscientização da população, já que a maioria dos casos podem ser evitados ao eliminar o principal fator de risco, o tabagismo ².

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		Homens Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Ministério da Saúde ²

Figura 1 - Distribuição de tipos de câncer mais frequentes por sexo estimados para 2018.

O câncer de pulmão é dividido em dois grupos distintos de acordo com sua formação tecidual e conformação celular: (1) câncer de pulmão de pequenas células e (2) câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), ou NSCLC, proveniente da sigla em inglês *non small cell lung cancer*. CPNPC é o tipo mais frequente, acometendo por volta de 85% de todos os cânceres de pulmão e é subdividido em 3 subtipos de acordo com sua formação tumoral e localização: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de pulmão de grandes células ^{3,4}.

O adenocarcinoma é o mais prevalente dentre os três subtipos e localiza-se geralmente na região periférica do pulmão. Esse subtipo costuma ter o envolvimento de células glandulares e produção de muco. De todos os casos não associados ao tabagismo, causados apenas por mutações germinativas, a grande maioria abrange o grupo de adenocarcinoma ^{5,6,7}. Já o carcinoma de células escamosas é o segundo mais prevalente, e surge normalmente no brônquio central e lobos do pulmão. Sua formação é ocasionada por uma transformação chamada de metaplasia, onde células epiteliais normais da traqueia e brônquios se modificam em células escamosas devido a constantes irritações e condições inflamatórias por conta do tabagismo, principalmente. Diferentemente do adenocarcinoma, não costuma envolver muco, mas pode haver o processo de queratinização. Dos pacientes acometidos a maioria tende a ser homens ^{7,6}. O terceiro subtipo de CPNPC é o câncer de pulmão de grandes células, e é considerado o mais raro, tendo comportamento mais agressivo e originando a partir de células epiteliais, localizando-se em qualquer parte do pulmão. Suas células são volumosas, por isso o nome de grandes células ⁵.

Grande parte dos pacientes demoram a perceber os sintomas, sendo então diagnosticados apenas em um estágio avançado da doença, na grande maioria das vezes já em

estágio metastático. Esse fato se deve à falta de sintomas no início da doença. Normalmente, os sintomas mais comuns são fadiga, dores e dispneia ⁸. Por conta do atraso no diagnóstico e da agressividade das células tumorais, a taxa de sobrevida entre esses pacientes é muito baixa, com taxa de sobrevida de 5 anos ficando em torno de apenas 15%, e há alguns anos atrás, não haviam tratamentos disponíveis que pudessem melhorar a sobrevida principalmente entre os pacientes metastáticos ⁹.

Hoje em dia já temos uma gama de tratamentos disponíveis que permitiram aumentar gradualmente a taxa de sobrevida desses pacientes. As terapias alvo e, mais recentemente, a imunoterapia, são exemplos desses tratamentos. Além deles, a cirurgia, quimioterapia e radioterapia podem ser indicados dependendo do estadiamento e condições físicas de cada paciente. Ainda muito utilizada, a quimioterapia vem sendo recomendada para os diferentes estadiamentos da doença, podendo ser utilizadas como monoterapia, combinada ou em protocolo adjuvante pós cirurgia ¹⁰.

Para se compreender melhor como esses tratamentos agem contra o câncer, é necessário conhecer primeiro as causas da formação dos carcinomas e, conseqüentemente, seus mecanismos de evasão.

A formação dos tumores, ou tumorigênese, depende da ativação de oncogenes, que, em boa parte são causadas por mutações somáticas e causas ambientais. Essas causas ambientais estão associadas de maneira direta a inflamações crônicas. Os principais causadores são microrganismos, algumas doenças autoimunes, a poluição e o tabaco ¹¹. O primeiro artigo a relacionar o aumento de casos de câncer de pulmão em vários países com o crescente uso de cigarro foi elaborado por Doll e Hill ¹². Neste trabalho, foram avaliados pacientes de diversos hospitais na Inglaterra com carcinoma de pulmão e foi observado que a maioria desses pacientes eram tabagistas. Outra observação feita no trabalho demonstra, nos anos avaliados (entre as décadas de 40 e 50), a correlação do crescente hábito de fumar em muitos países ao crescimento no número de casos da doença nesses mesmos países ¹².

Hoje já se é bem conhecido que as toxinas provenientes do cigarro causam inflamação tecidual, a principal causa para o desenvolvimento de neoplasia de pulmão, sendo este o fator de risco responsável por 80% dos casos ¹³. Dentre esses, muitos são os chamados fumantes passivos, que apesar de não fazerem o uso direto de cigarro podem se expor de maneira indireta, inalando as toxinas provenientes do cigarro apenas estando constantemente próximos a fumantes. Esse fato se agrava ainda mais quando há esse tipo de exposição desde a infância ¹⁰.

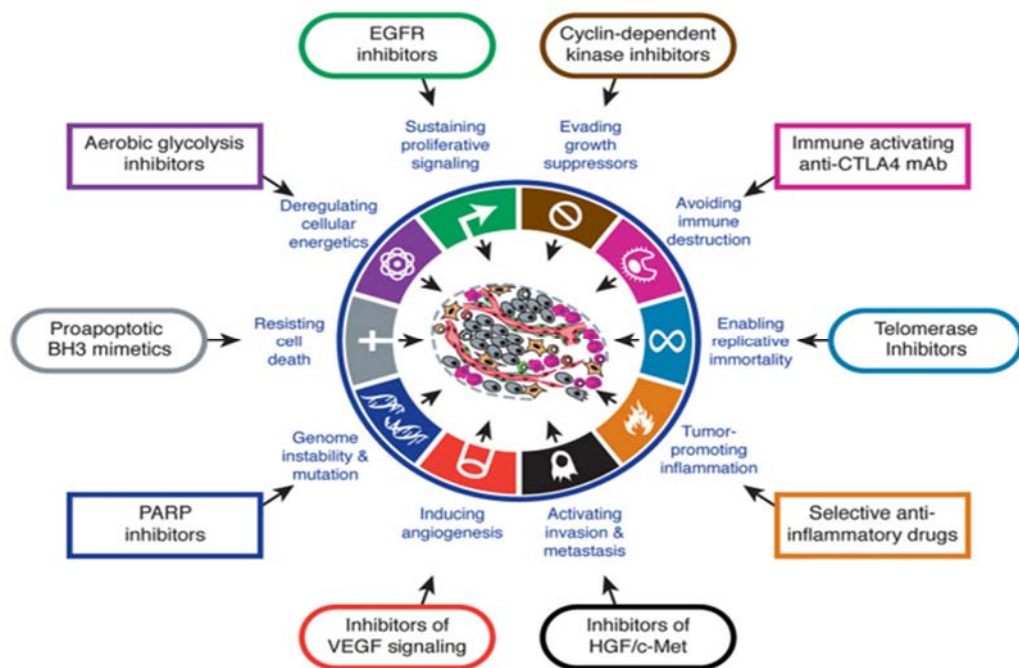
Apesar do principal causador ser o tabaco, observam-se casos de câncer de pulmão que não envolvem o cigarro. Nesses casos, outros fatores ambientais, como a poluição, e mutações

germinativas costumam ser as responsáveis. No CPNPC, as mutações mais comuns são de origem somática nos genes que codificam EGFR e KRAS. Esses genes estão envolvidos em cascatas de sinalização imprescindíveis para o desenvolvimento normal da célula. Quando ocorre a mutação nestes genes, há uma interferência de maneira direta nos processos de proliferação e invasão celular, favorecendo a tumorigênese ¹⁴.

Outro fator importante que aumenta significativamente as chances de ter câncer é a idade, já que nessa fase o sistema imunológico se encontra com certo comprometimento da função, com deficiência de células T efectoras, responsáveis pelo combate a células tumorais ¹⁵.

1.3 FORMAÇÃO DO CÂNCER E MICROAMBIENTE TUMORAL

Para que aconteça a formação e a permanência de células tumorais e conseqüentemente ocorra a carcinogênese é necessário um ambiente favorável para essa célula, inibindo a apoptose e estimulando a angiogênese e hipóxia. Esse ambiente inclui um aglomerado de células estromais, endoteliais, malignas e células do sistema imune formando uma complexa interação entre elas ¹⁶. Considerando esses mecanismos favoráveis à tumorigênese, Hanahan e Weinberg ¹⁷ publicaram um importante artigo onde descrevem dez acontecimentos responsáveis por mudanças genéticas e fisiológicas nas células, transformando-as em cancerígenas ¹⁷. Nesse mesmo trabalho é descrito que, para que uma célula anteriormente saudável se transforme em uma célula tumoral, é necessária a presença de distintos tipos celulares, que interagem entre si e com as células tumorais.



Fonte: Hanahan, Weinberg ¹⁷

Figura 2 - Ilustração com os dez fatos relacionados à carcinogênese.

O primeiro mecanismo para o desenvolvimento de célula tumoral citado no artigo é um desencadeamento de mutações que estejam envolvidas em erros na proliferação e apoptose celular e também no reparo de DNA. Normalmente as mutações mais comuns em câncer de pulmão costumam ser em p53, KRAS e EGFR ¹⁸.

Obter informações a respeito dessas mutações é importante para oferecer o melhor tratamento para cada paciente. Como exemplo, para os pacientes com mutações em EGFR o tratamento mais adequado seria de terapia alvo, com inibidores de tirosina quinase ¹⁹. EGFR é um receptor de tirosina quinase, que é uma proteína envolvida num processo de sinalização que envolve várias outras proteínas e reações de fosforilação. Essa fosforilação ativa diversas vias celulares incluindo a divisão, motilidade, proliferação e adesão celular. Uma vez mutado, o gene de EGFR acaba por afetar essas vias de sinalização, influenciando o funcionamento normal das células ^{19,20}. Os pacientes que possuem essas mutações ativadoras, que na maioria das vezes estão localizadas no éxon 19 ou 21 do gene EGFR, provocam alterações estruturais no sítio de ligação a ATP do domínio extracelular do EGFR, aumentando assim a afinidade com inibidores de tirosina quinase e levando a uma boa resposta clínica ¹⁹.

Outra mutação importante não só para o câncer de pulmão, mas para muitos outros tipos de câncer envolve o gene KRAS. KRAS é uma proteína de ligação que atua como iniciadora na transdução de sinal para proliferação celular ²¹. A mutação no gene KRAS costuma ter

relação com fumo e com os subtipos de adenocarcinoma em cânceres de pulmão. Os pacientes com essa mutação costumam ter pior sobrevida em comparação com os que não possuem a mutação ²².

Outra mutação de grande relevância para o câncer de pulmão é no gene p53, cuja função é a de evitar propagação de possíveis erros causados por outros genes. Ele é ativado em resposta a sinais de danos celulares, e induz a parada do ciclo celular, incitando o reparo ou apoptose da célula defeituosa. Uma vez mutado esse gene, iniciam-se as transformações malignas, pois escapam desse reparo e apoptose ²³. A partir dessas mutações, a célula defeituosa segue proliferando e perdendo a capacidade de apoptose, e aos poucos inicia-se a formação de uma massa tumoral, com inúmeras células mutadas.

Essa massa tumoral iniciada por mutações ainda possui capacidade da replicação descontrolada, evitando assim sua senescência e morte. Senescência é o envelhecimento celular. Nas terminações dos nossos cromossomos é possível encontrar estruturas denominadas telômeros que são responsáveis por controlar o tempo de vida celular. No caso das células tumorais elas fazem uso de uma enzima chamada telomerase, que permite que os telômeros se renovem a todo momento, apesar das sucessivas replicações celulares, evitando o processo de senescência ²⁴.

Sobre essas células transformadas age o nosso sistema imunológico, com a tentativa de combater tais células. Na grande maioria das vezes, as células que fazem parte tanto do sistema imune inato quanto do adaptativo trabalham e conseguem eliminar grande parte dessas células tumorais. No entanto, algumas células podem driblar as ações do sistema imunológico evitando sua detecção e conseqüentemente sua destruição. São vários os mecanismos e as células envolvidas no combate tumoral ²⁵. Essa interação de células tumorais com o as células imunológicas podem levar a efeitos de dualidade. De um lado o sistema imunológico é capaz de eliminar as células da tumorigênese mas também pode acabar estimulando o crescimento do tumor auxiliando na cascata metastática. A essa interação dá-se o nome de imunoedição do câncer, dividindo-se em 3 fases distintas: eliminação, equilíbrio e escape ²⁵⁻²⁷.

Na primeira fase, também conhecida como imunovigilância, nosso sistema imune elimina, por meio de células inflamatórias e com liberação de citocinas a maioria das células tumorais e prevalece com essa eliminação caso alguma outra célula cancerígena surja em nosso organismo. Esse processo acontece naturalmente e na grande maioria das vezes essa eliminação é feita de maneira eficaz. Porém, em alguns casos, algumas células tumorais podem resistir às ações do sistema imune, sobrevivendo, mas permanecendo em dormência. Quando essa dormência celular ocorre passa-se para a segunda fase denominada de equilíbrio. Essa fase pode

durar por anos e é nesse momento que pode acabar acontecendo a seleção das células tumorais mais resistentes à pressão de citocinas e células imunes, podendo ocorrer mutações que favoreçam ainda mais as células tumorais. Quando isso acontece, passa-se para a terceira fase, de escape, que consiste em clones tumorais resistentes que acabam crescendo de maneira independente, apesar da tentativa de controle do sistema imunológico. Essas células conseguem se proliferar, estimular a angiogênese para seu crescimento e alimentação e sem o devido tratamento, podem chegar ao estágio de metástase ^{25,27}.

Normalmente as células que primeiro detectam a formação do tumor são as células apresentadoras de antígenos ou APC (da sigla em inglês, *antigen presenting cell*). Para serem caracterizadas como APC, a célula deve expressar moléculas em sua superfície denominadas MHC (*major histocompatibility complex*), que tem como função apresentar antígenos próprios ou estranhos para células T. Em suma, todas as células nucleadas podem expressar MHC de classe I, porém somente APC profissionais são capazes de expressar MHC classe II, que incluem as células B, células dendríticas e macrófagos ^{28,29}.

As células dendríticas são consideradas as APCs mais eficientes em iniciar a resposta imune e em promover a comunicação do sistema inato com o sistema adaptativo. Sua característica especializada permite a captura, internalização, processamento e apresentação de antígenos próprios e antígenos que possam interferir na homeostase do organismo ³⁰. No caso de tumores, os antígenos incluem aqueles gerados por oncovírus, oncogenes, genes supressores de tumor, antígenos oncofetais, glicolipídeos e glicoproteínas alteradas ³¹.

Esses antígenos são apresentados pelos complexos MHC classe I e II para o reconhecimento pelo receptor chamado TCR (*T cell receptor*) existentes nas células T CD8 e T CD4, respectivamente. Para o encontro com as células T, as células dendríticas migram para os órgãos linfoides periféricos, como o linfonodo ³². Nesse encontro ocorrem três sinais para a ativação das células T: o primeiro sinal acontece com a interação do antígeno capturado com o TCR da célula T; o segundo sinal, considerado coestimulador, ocorre principalmente com a ligação de moléculas da família B7 presentes em APC com a molécula CD28 presente na superfície das células T; e um terceiro sinal que resulta na produção de citocinas pelas APC ou pelos próprios linfócitos capazes de regular a diferenciação e ativação dos linfócitos T ³².

Os linfócitos B e os macrófagos possuem a mesma capacidade de ativação e diferenciação de células T, no entanto essas células dispõem de outros papéis dentro do microambiente tumoral. Além disso, essas células possuem atividades ambíguas dentro do microambiente tumoral, podendo ter atividades tanto favoráveis quanto desfavoráveis à tumorigênese.

No caso dos macrófagos ou TAMs (*tumor associated macrophages*), nome dado quando os macrófagos estão no microambiente tumoral, é possível observar dois diferentes fenótipos: macrófago do tipo 1 (M1) e macrófago do tipo 2 (M2). Esses dois tipos de macrófagos, apesar de dispor da mesma célula precursora, os monócitos circulantes provenientes da medula óssea, apresentam atividades antagonistas entre si. Enquanto o perfil M1 libera citocinas consideradas inflamatórias como IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- α , contribuindo para uma resposta anti-tumoral, os macrófagos M2 produzem altos níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β , o que acaba favorecendo a formação do tumor^{16,33,34}. Parte dessa heterogeneidade diz respeito à habilidade de TAMs em adquirir um perfil em resposta à influência do microambiente. Macrófagos M1 tendem a se acumular no microambiente tumoral no início da tumorigênese e são normalmente associados com um alto metabolismo glicolítico, secreção de lactato e biossíntese de nucleotídeos. Esse ambiente acaba estimulando o perfil M1 para a produção de ROS (*reactive oxygen species*), o que limita a viabilidade da célula maligna por evitar a angiogênese. Para o perfil M2 já se é observado metabolismo oxidativo e, ao contrário de M1 é caracterizado por um ambiente de hipóxia, o que influencia na produção de substâncias como VEGF-A (vascular endotelial growth fator – A) e AMD (adrenomedulin) que são responsáveis por um sítio pró angiogênico, aumentando a disponibilidade de nutrientes para células do tumor^{16,34}.

Linfócitos B, assim como os macrófagos, possuem atividade tanto protetora quanto promotora da tumorigênese. Células B, além de serem APC profissionais, possuem a capacidade de produção de anticorpos, e quando isso acontece, passam a ser chamadas de plasmócitos. As células B também são capazes de se diferenciar em células B de memória. Essas células circulam no sangue e caso um antígeno antes reconhecido por ela reapareça, as células B de memória se diferenciam em células produtoras de anticorpos rapidamente e já conseguem eliminar os patógenos de maneira mais rápida e eficaz. Por essas funções, as células B podem auxiliar no combate ao tumor, principalmente se o antígeno estiver relacionado a um oncovírus^{32,33,35}. Porém, de acordo com Spaner e Bahlo (2011), uma vez o tumor já estabelecido, as células B provavelmente poderiam facilitar a progressão tumoral, dependendo do tipo e tamanho do tumor³². A correlação entre anticorpos antitumorais e progressão da doença poderia estar relacionada à geração de imunocomplexos circulantes que aumentariam a hiperproliferação e progressão de células malignas. Além disso, a secreção exacerbada poderia inflamar o parênquima tumoral estimulando a angiogênese. Em adição, um subtipo de células B chamadas de células B reguladoras produzem citocinas como IL-10 e TGF- β , que assim como

os macrófagos M2, suprimem a resposta inflamatória e inibem a função efetora de linfócitos T CD8, T CD4 e células natural killer (NK) ³².

Linfócitos T CD8, T CD4 e células NK são de extrema importância ao combate tumoral. Todas elas são de origem linfoide, porém as células NK fazem parte da imunidade inata e linfócitos T CD4 e T CD8 fazem parte da imunidade adaptativa. Apesar dessa diferença, células NK e linfócitos T CD8 possuem funções citotóxicas bem semelhantes, principalmente na liberação de enzimas como granzima e perforina. Além disso, ambas secretam citocinas como IFN- γ , que é responsável pela ativação de macrófagos ³⁶.

A atividade das células NK é dependente de sinais de ativação ou inibição que são transmitidos através de seus receptores. Os receptores de inibição existentes nas células NK se unem a diversos tipos de ligantes existentes em células consideradas saudáveis. Essas ligações previnem as células NK de matarem células viáveis. Dentre os receptores de inibição mais importantes encontramos KIRs, CD94/NKG2A e ILT2/CD85. KIR (*Killer Ig-like receptor*) liga-se ao MHC de classe I e essa interação é de extrema importância para interação de células NK com as células cancerígenas, uma vez que essas deixam de expressar MHC de classe I como estratégia para evitar reconhecimento de antígenos, evadindo assim da ação citotóxica das células T CD8. No entanto, células NK utilizam-se da falta de MHC de classe I para identificação de células tumorais. Uma vez identificando a célula, NK libera perforina e granzima (da mesma maneira que linfócitos T CD8), induzindo a apoptose da célula alvo ³⁷.

Os receptores de ativação das células NK participam do combate tumoral ao induzir a secreção de citocinas mediante o reconhecimento de proteínas existentes em células danificadas. Entre os receptores de ativação incluem-se NCRs (NKp46, p30, NKp44), NKG2D, DNAM1, CD16 entre outros. CD16 se liga à porção Fc de Ig (anticorpos produzidos por células B) em células opsonizadas, estimulando a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) ^{37,38}.

As células NK, assim como os macrófagos, se diferenciam em subtipos. Esses subtipos são definidos por maior ou menor expressão de CD56 e CD16. Alta expressão de CD56 teria maior expressão de NKG2A, um baixo nível de perforina e são mais especializados na produção de citocinas. Já uma maior expressão de CD16 se relaciona a uma maior expressão de KIRs e maiores níveis de perforinas. Ainda há um debate se tais subtipos são subpopulações distintas ou apenas diferentes estágio de maturação ³⁶.

Em estudos comparando tecidos de pacientes com CPNPC e tecidos de pacientes saudáveis observa-se que nas áreas tumorais há uma menor frequência de células NK, quando comparado com pessoas saudáveis ou mesmo tecidos normais do próprio paciente. Ao que tudo

indica, essa diminuição de células NK podem ter relação com inflamações decorrentes do tabagismo³⁹.

Como já mencionado anteriormente, a célula T CD8, considerada uma célula citotóxica, possui mecanismos de indução de apoptose semelhantes a células NK. Diversos artigos já descreveram que a presença de células T CD8 no microambiente tumoral tende a aumentar a sobrevida e melhorar a resposta aos tratamentos de pacientes com inúmeros tipos de câncer, inclusive para os pacientes com CPNPC^{39, 40,41}. Após diferenciadas em células efetoras, e após o reconhecimento do antígeno tumoral, a célula T CD8 libera perforina que será responsável por gerar poros na célula do tumor, e granzima que induz apoptose dessa mesma célula. Além desse mecanismo, linfócitos T CD8 também podem induzir a morte celular através de ligação do FAS ligante junto ao FAS, que é expresso em várias células, inclusive na célula tumoral. Essa ligação induz a apoptose por via de caspases. De modo a aumentar a ação contra o tumor, o linfócito T CD8 ainda é capaz de secretar TNF- α e IFN- γ , importantes para o recrutamento e ativação de macrófagos. Após sua fase efetora, as células T CD8 se transformam em células T CD8 de memória, que são importantes para gerar uma resposta anti-tumoral duradoura^{40,42}.

As células T CD8 podem receber ajuda de outra população de linfócito T, a célula T CD4. Como também já citado, as células T CD4 são capazes de reconhecer antígenos via MHC classe II que estão presentes apenas nas APC profissionais. Uma função importante das células T CD4 diz respeito à produção e liberação de citocinas essenciais para a resposta imunológica contra o tumor. Existem quatro subtipos principais de células T CD4 e suas diferenças são baseadas principalmente nas citocinas que cada uma delas produz e aos fatores de transcrição que elas expressam. São elas: Th1, Th2, Th17 e células T reguladoras. As células Th1 são ativadas por IL-12 e secretam citocinas como IL-2, IFN- γ , TNF- α e MCP-1 α , e costumam ser as principais responsáveis pela resposta imune antitumoral, uma vez que ativam as células T CD8 citotóxicas e também medeiam a citotoxicidade de células NK, além de possuírem a capacidade de aumentar a expressão de MHC em APCs, também a partir da liberação das citocinas citadas. Em contrapartida, as células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, e são responsáveis por promover principalmente a resposta a alergias e a defesa contra helmintos. Pelo fato de secretarem citocinas anti-inflamatórias, o que acaba inibindo a produção das citocinas provenientes de Th1, as células Th2 são mais relacionadas à progressão do tumor. No entanto, alguns trabalhos sugerem que a produção de algumas citocinas liberadas por células Th2, como IL-4, podem contribuir para a atividade antitumoral, pois aumentaria a infiltração de eosinófilos e macrófagos do tipo 1 para o sítio do tumor⁴³. Esses estudos demonstram que a atividade de células Th2 em relação à atividade anti-tumoral tendem a ser contraditórios. As

células Th17 produzem IL-17, além de IL-21, IL-22 e IL-26. Essas células possuem papel relevante no desenvolvimento de doenças autoimunes, além de poderem favorecer o desenvolvimento do tumor ⁴⁴. Outra subpopulação de célula T CD4 com importante papel imunossupressor são as células T reguladoras. Elas são caracterizadas pela expressão de Foxp3 e CD25, principalmente. Foxp3 é uma proteína envolvida no desenvolvimento e função das células T reguladoras. Em indivíduos saudáveis, a presença de células T reguladoras auxilia para a homeostase, prevenindo o organismo de desenvolvimento de doenças autoimunes e alergias. Porém, quando as células T reguladoras se encontram no microambiente tumoral, tendem a ser favoráveis ao tumor por evitar a função de outras células efetoras, como as células T CD8, ao liberarem citocinas como IL-10, TGF- β e IL-35. Observa-se tanto em tecidos tumorais humanos quanto em tecidos tumorais de camundongos que o aumento de células T reguladoras e consequentemente diminuição de células T CD8 estão relacionados a um pior prognóstico. Esse fato já foi observado em inúmeros tipos de cânceres, incluindo o CPNPC ^{43,45}.

Células como linfócitos T CD4, linfócitos T CD8, células NK e macrófagos possuem a expressão em sua superfície de PD-1 (*programmed cell death protein 1*), considerado um marcador de exaustão celular. Não somente PD-1, mas também TIM3, Lag3 e outras moléculas, são expressos na superfície celular quando as células são constantemente expostas ao mesmo antígeno. Os ligantes de PD-1 são PD-L1 (*programmed cell death ligant 1*) e PD-L2 (*programmed cell death ligant 2*). Esses ligantes são normalmente encontrados em APC, mas as células tumorais também podem expressar os mesmos ligantes em sua superfície, capazes de se associar ao PD-1 e impedindo a atividade citotóxica das células imunes ^{46,47,42}.

Além das células citadas anteriormente, que podem contribuir com a progressão e evasão tumoral, os fibroblastos vêm sendo ativamente associados com a carcinogênese em diversos órgãos e em especial no câncer de pulmão. Eles são capazes de causar a desmoplasia, que é o crescimento exacerbado de tecido conjuntivo, muito comum em CPNPC. Quando os fibroblastos fazem parte deste microambiente tumoral, passam a ser chamados de CAFs (da sigla em inglês *cancer associated fibroblast*). CAFs contribuem para a proliferação celular, angiogênese, invasão das células tumorais para outros tecidos e também resistência a algumas drogas. CAFs também causam o espessamento da matriz extracelular, e acaba dificultando a infiltração de células com atividade antitumoral, como linfócitos T citotóxicos, células NK, entre outras ^{17,24}.

1.4 METÁSTASE TUMORAL

Não recebendo o tratamento adequado, o tumor primário pode se espalhar para outros tecidos. Para que isso ocorra é necessário que a célula tumoral perca a sua capacidade de adesão, consiga degradar a matriz extracelular e aumente sua motilidade. O desajuste na adesão celular ocorre principalmente por conta de alterações na expressão de E-caderina. As caderinas abrangem uma classe de moléculas que permitem a adesão celular em superfícies de camadas epidérmicas. A E-caderina é a principal caderina envolvida nessa adesão celular e a redução de sua expressão está relacionada com carcinogênese ⁴⁸.

Esses fatores fazem com que algumas das células tumorais consigam escapar do tumor primário e passem a circular pelo organismo. Uma vez na corrente sanguínea elas são capazes de migrar para outros órgãos. Quando instalado em outro órgão, as células tumorais estimulam a formação de novos vasos para sua alimentação e geram desregulação energética, com geração de ATP por glicólise e consequente formação de lactato. Um último mecanismo de auto-sustentação utilizado pelo tumor é a capacidade da própria célula produzir fatores de crescimento com ação autócrina ou parácrina ^{18,49}.

A maioria dos pacientes com CPNPC desenvolvem metástase, e já se é sabido que o câncer de pulmão é responsável por aproximadamente 50% de todos os casos de metástases cerebrais, o que torna o tratamento da doença ainda mais complicado. A metástase resulta em uma diminuição significativa na taxa de sobrevida global dos pacientes ⁵⁰.

2 JUSTIFICATIVA

Com a necessidade de uma melhor compreensão do papel do sistema imunológico em pacientes com CPNPC metastáticos ou não metastáticos e os possíveis fatores desencadeadores de metástases, pretendemos determinar nesse trabalho os perfis imunes sistêmicos desses pacientes pela avaliação tanto de células imunes quanto de citocinas e quimiocinas.

Diferenças no estadiamento do tumor podem estar relacionados a importantes alterações no perfil imune de cada paciente, alterando a dinâmica do microambiente tumoral e a interação entre as células e substâncias solúveis ali presentes. Neste contexto, acreditamos que nossos resultados possam auxiliar para uma melhor compreensão do desenvolvimento de metástase nos pacientes portadores de câncer de pulmão de não pequenas células.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar comparativamente o perfil imune celular e solúvel de pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC) metastáticos e não metastáticos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar citocinas e quimiocinas presentes no plasma de pacientes metastáticos e não metastáticos virgens de tratamento.
- Avaliar os perfis celulares sistêmicos entre os mesmos dois grupos de pacientes virgens de tratamento.
- Correlacionar citocinas e células do sistema imune entre si e associar ao desenvolvimento da doença metastática em pacientes com CPNPC.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PACIENTES

Foram incluídos no estudo um total de 39 pacientes diagnosticados com CPNPC no A.C.Camargo Cancer Center (São Paulo, SP) no período de julho de 2018 a dezembro de 2019. Dentre esses 39 pacientes, 28 foram classificados como metastáticos (estadiamento IV) e 11 foram classificados como não metastáticos (estadiamentos I, II ou III).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-CEP do A.C.Camargo Cancer Center (protocolo nº 2463/17) (Anexo 1) e para todos os pacientes participantes do estudo, foi aplicado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e todos aceitaram fazer parte do estudo de maneira voluntária (Apêndice 1). Como critérios de inclusão para nosso estudo, participaram aqueles maiores de 18 anos, de ambos os sexos, não recebendo tratamento sistêmico prévio para nenhum tipo de câncer nos últimos 5 anos.

4.2 COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO

Todas as coletas foram feitas antes do início de qualquer tratamento. As coletas foram ajustadas para os dias de exames e/ou infusões de medicações de cada participante, a fim de causar um menor desconforto.

O sangue foi coletado em tubos contendo anticoagulante EDTA e mantido à temperatura ambiente até o momento do processamento, padronizado para um intervalo de 2 a 4 horas após a coleta. Para a análise por citometria de fluxo foi coletada uma alíquota de sangue fresco total anteriormente ao processamento.

4.3 COLETA E ARMAZENAMENTO DE PLASMA

O sangue foi centrifugado a 400 x g, por 5 minutos, a uma temperatura de 20°C para separação de plasma. O plasma foi coletado e distribuído em criotubos para armazenamento a -80°C. O restante do sangue foi centrifugado em gradiente de Ficoll para purificação de PBMC (células mononucleares do sangue periférico) conforme protocolo estabelecido. PBMC foram congelados e armazenados em nitrogênio líquido para posterior análise em outros projetos.

4.4 CITOMETRIA DE FLUXO

O sangue fresco total foi incubado na presença de bloqueador de receptores Fc (Fc block) por 10 minutos. Após a incubação, adicionou-se um mix dos anticorpos de interesse, que incluem CD3 FITC, CD4 BV510, CD8 PE-Cy7, CD56 PE; CD107a APC, PD-1 BV421 CD69 APC-Cy7, CD14 APC, CD16 PE-Cy7, PD-L1 BV421, PD-L2 PE, CD11c PerCP-Cy5.5. As células foram incubadas com os anticorpos de interesse por 15 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo de luz, e em seguida o sangue foi submetido à lise de hemácias. Após lavagem com PBS, as amostras foram ressuspensas em PBS / 2% formaldeído e adquiridas ao citômetro de fluxo BD FACSymphony A5.

4.5 ESTRATÉGIAS DE ANÁLISES PARA CITOMETRIA DE FLUXO

Para análises dos dados de citometria de fluxo, dividimos em duas etapas distintas: análise não supervisionada por “machine learning” e análise supervisionada para criação de gates e identificação de populações manualmente. Ambas as análises foram realizadas com o auxílio do software FlowJo (BD Biosciences).

Para a análise não supervisionada, utilizamos da ferramenta de redução de dimensão e análise de dimensões *t-Distributed Stochastic Neighbor Incorporating* (t-SNE). Essa ferramenta permitiu a identificação de subpopulações e metaclusters específicos de cada grupo de estudo, com base na expressão de vários marcadores. Para a análise manual foram definidos gates característicos de cada população imune avaliada.

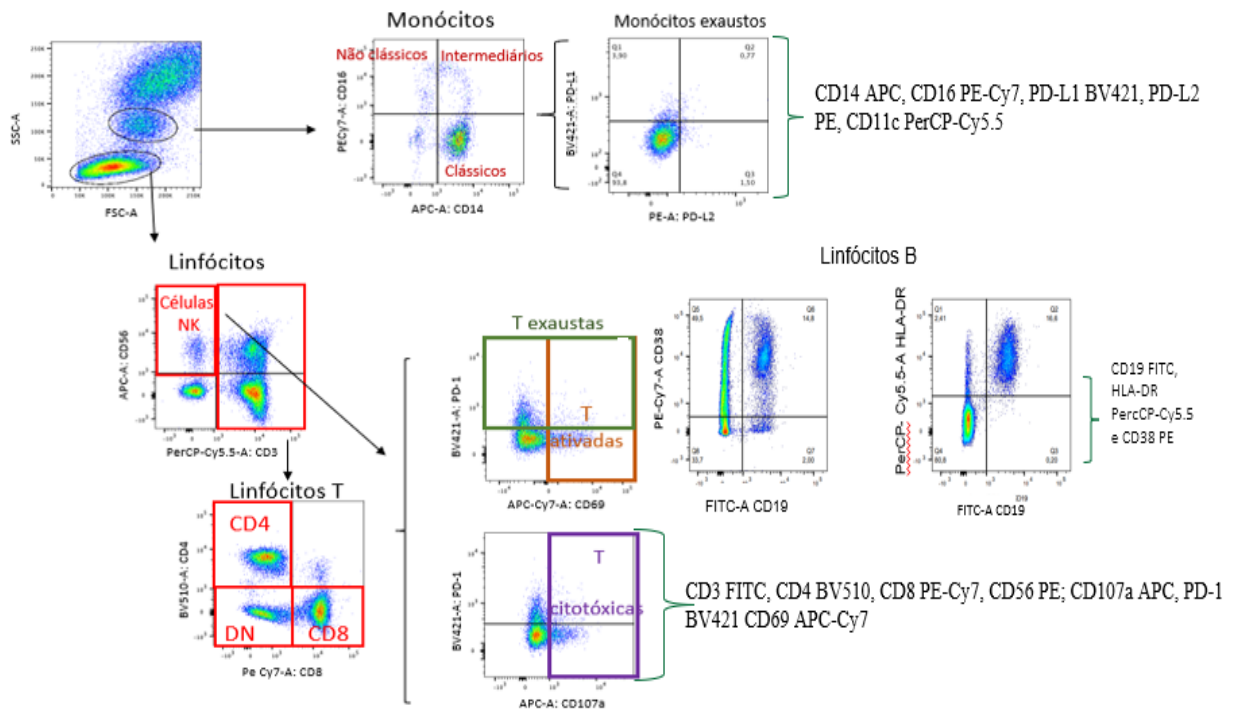


Figura 3 - Ilustração com estratégia de gates utilizados para identificação de células linfocitárias e mieloides através do software flowJo.

4.6 ENSAIO MULTIPLEX PARA ANALITOS SOLÚVEIS

A avaliação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento foi realizada por ensaio multiplex, utilizando a plataforma Bio-Plex (BioRad). Utilizamos o kit para 48 analitos Bio – Plex Pro human cytokine Screening Panel, 48- Plex, seguindo instruções do fabricante. Foram avaliadas os seguinte analitos: β -NGF, CTACK, Eotaxina, FGF basic, G-CSF, GM-CSF, GRO- α , HGF, IFN- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-2ra, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-18, IP-10, LIF, M-CSF, MCP-1, MCP-3, MIF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, SCF, SCGF- β , SDF-1 α , TNF- α , TNF- β , TRAIL e VEGF.

Primeiramente as beads foram lavadas de acordo com o manual fornecido pelo fabricante para retirada de qualquer pigmentação remanescente. Às beads devidamente lavadas foi adicionado o plasma dos pacientes. As amostras foram então incubadas *overnight* em agitador a 850 rpm, ao abrigo da luz. Após a incubação, as amostras foram lavadas e posteriormente adicionado o mix de anticorpos de detecção, permanecendo em agitador durante 30 minutos a 850 rpm, ao abrigo de luz. Após nova lavagem, foi acrescentada a estreptavidina-

PE e novamente foram incubados durante 10 minutos em agitador a 850 rpm, ao abrigo de luz. Ao fim da incubação, as amostras foram novamente lavadas e ressuspensas em tampão para aquisição no equipamento, com o auxílio do software Bio-Plex 200.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estatísticas foi utilizado o software GraphPad Prism 8. Inicialmente aplicou-se o teste de normalidade pelos métodos Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Aos dados que passaram no teste de normalidade (ou paramétricos) foi aplicado o teste t de Student. Já para os dados que não passaram no teste de normalidade, aplicamos o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados com valor de p menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Para os testes de correlação também foi aplicado o teste de normalidade, seguindo o mesmo protocolo descrito. Aos que passaram no teste de normalidade, foi utilizada a correlação de Pearson e para os que não passaram no teste de normalidade foi utilizado a correlação de Spearman.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DOS PACIENTES ESTUDADOS

Foram recrutados para nosso estudo 39 pacientes, sendo 11 deles classificados como não metastáticos e 28 pacientes classificados como metastáticos. Na Tabela 1 são mostrados parâmetros como idade, sexo, presença ou não de mutações, tabagismo e estadiamento clínico de cada grupo de paciente estudado.

Observa-se que a média de idade dos pacientes não metastáticos presentes no estudo é de 68 anos, com mediana de 69 anos. Já nos pacientes metastáticos a média foi de 65 anos e mediana de 67 anos. A maioria dos pacientes são do sexo masculino nos dois grupos, 63,64% em não metastáticos e metastáticos. Com relação ao número de pacientes tabagistas, observamos novamente similaridades entre os dois grupos, onde a maioria dos pacientes são de fato tabagistas ou já foram tabagistas tanto no grupo de não metastáticos (81,82%) quanto no grupo de metastáticos (78,57%).

A ausência de mutações relacionadas a câncer de pulmão em pacientes metastáticos demonstrou-se aumentada em relação aos que possuem mutações (57,14%). No entanto, o aumento relacionado à presença ou ausência de mutações entre o grupo de não metastáticos acabou sendo prejudicado pela falta dessa informação, já que em 54,55% não obtivemos conhecimento.

O subtipo adenocarcinoma é mais prevalente tanto no grupo dos não metastáticos (81,82%) quanto no grupo dos metastáticos (85,71%), quando comparado ao subtipo de células escamosas.

Tabela 1 - Tabela de caracterização dos grupos de pacientes estudados. pacientes metastáticos (N=28) e pacientes não metastáticos (N=11).

	Pacientes com CPNPC (N= 43)	
	Pacientes Não Metastáticos (n=11)	Pacientes Metastáticos (n=28)
Idade		
Média	68 anos	65 anos
Mediana	69 anos	67 anos
Sexo		
Masculino	n= 07 (63,64%)	n= 15 (54%)
Feminino	n= 04 (36,36%)	n= 13 (46%)
Tabagismo		
Sim	n= 09 (81,82%)	n= 22 (78,57%)
Não	n= 02 (18,18%)	n= 06 (21,43%)
Presença de Mutações		
SIM- EFGR	n= 01 (09, 09%)	n= 04 (14,29%)
SIM- KRAS	n= 02 (18,18%)	n= 03 (10,71%)
SIM- HER 2		n= 02 (07 %)
NÃO	n= 02 (18,18%)	n= 16 (57, 14%)
Sem informação	n= 06 (54,55%)	n= 03 (10,71%)
Subtipos de CPNPC		
Adenocarcinoma	n= 09 (81,82%)	n= 24 (85,71%)
Escamoso	n= 02 (18,18%)	n= 04 (14,29%)
Estadiamentos		
T (tamanho do tumor)		
T Mensurável	n=10 (91%)	n= 19 (68%)
T1- (Mensurável)	n=01 (10%)	n= 01 (05%)
T2- (Mensurável)	n= 05 (50%)	n= 03 (16%)
T3- (Mensurável)	n= 04 (40%)	n= 08 (42%)
T4- (Mensurável)		n= 07 (37%)
T Não Mensurável		n= 09 (32%)
Não Informado	n= 01 (09, 09%)	
N (Linfonodo comprometido)		
N Mensurável	n=09 (82%)	n= 17 (61%)
N0 (Mensurável)	n= 02 (22%)	
N1 (Mensurável)	n= 01 (11%)	n= 02 (12%)
N2 (Mensurável)	n= 05 (56%)	n= 07 (41%)
N3 (Mensurável)	n= 01 (11%)	n= 08 (47%)
N Não Mensurável		n= 11 (39,29%)
Não Informado	n= 02 (18,18%)	
EC (Estadiamento clínico)		
EC II	n=01 (09,09%)	
EC III	n= 09 (81,82%)	
EC IV		n= 28 (100%)
Não Informado	n= 01 (09, 09%)	
M (Presença de metástase)		
M1		n= 28 (100%)

A respeito do estadiamento relacionado ao tamanho do tumor (T), o grupo metastático demonstrou, em sua maioria T3 (48%) entre os tumores mensuráveis e 39% entre os tumores não mensuráveis, já o grupo de não metastáticos concentrou a maioria dos pacientes em T2 (50%) e T3 (40%) nos tumores mensuráveis. Para o estadiamento relacionado ao comprometimento de linfonodos (N), no grupo de pacientes não metastáticos o N2 apareceu como mais prevalente, com 56 % entre os N considerados mensuráveis. No grupo de pacientes metastáticos, a maioria dos pacientes se encaixaram em Não mensuráveis, com 39,29%.

A maioria dos pacientes não metastáticos que entraram no estudo possui estadiamento clínico EC III (81, 82%).

5.2 IDENTIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES CELULARES DIFERENCIALMENTE PRESENTES NOS DOIS GRUPOS DE PACIENTES

Com a intenção de verificar se poderiam existir diferenças em relação às subpopulações linfocitárias e de células mieloides entre os dois grupos estudados, utilizamos a ferramenta de tSNE, com o software Flow Jo. O tSNE identifica populações como clusters usando um algoritmo de “machine learning” que não depende de nossa interferência. Este método identifica populações diferentes que depois podem ser estudados com maiores detalhes e que ajudam na descrição de modelos de imunoregulação. Nossos resultados permitiram observar diferentes subpopulações em ambos os grupos estudados (Figuras 3 e 4). Por meio dos marcadores CD3, CD56, CD4, CD8 CD69, CD107a e PD-1 (Figura 3.B) foi possível a identificação de 10 subpopulações linfocitárias e para a identificação das 10 subpopulações de origem mieloide, utilizaram-se os marcadores CD14, CD16, PD-L1, PD-L2, CD11b e CD11c (Figura 5.B). Devido às diferenças de fluorocromos dos anticorpos utilizados nos painéis ao longo do recrutamento dos pacientes, tivemos que realizar nossas análises de tSNE com um número reduzido de pacientes. Sendo assim, nossas análises foram realizadas com 12 pacientes dos 39 estudados, sendo 6 deles do grupo de não metastáticos e 6 do grupo de metastáticos. Nos dois painéis é possível observar que das 10 subpopulações, as 4 primeiras (populações de 1 a 4) fazem parte do grupo de pacientes não metastáticos (representado em azul nas figuras 4.A e 5.A), e as 6 últimas subpopulações encontradas (populações 5 a 10) fazem parte do grupo de pacientes metastáticos (representado em vermelho nas figuras 4.A e 5.A).

Na Figura 4, onde analisamos as subpopulações de linfócitos, foi possível identificar 3 subpopulações de linfócitos T CD8+ (CD3+CD8+CD56low), representadas nas populações 2,3

e 4, e ainda foi observado que as populações 3 (CD3+CD8+CD56lowCD69+CD107a+) e 4 (CD3+CD8+CD56lowCD69+) são consideradas como linfócitos T CD8+ ativados. Já no grupo de metastáticos, observamos 2 populações de linfócitos T CD4 (CD3+CD4+) representadas pelas populações 5 e 10, essa última sendo considerada linfócito T CD4 exausto (CD3+CD4+PD-1+). Também foi possível encontrar uma população de NKT CD8 ativada, representada pela população 6 (CD3+CD8+CD56+CD69+) e ainda duas populações de linfócitos T duplo-positivos exaustos representada nas populações 8 (CD3+CD4+CD8+CD56+CD69lowPD1+) e 9 (CD3+CD4+CD8+CD69lowPD-1+).

Ao analisarmos a figura 5, para avaliação de células de origem mieloide, observamos no grupo de não metastáticos 3 populações de monócitos intermediários, sendo as populações 1, 2 e 3 (CD14+CD16+CD11b+), e uma população de monócitos clássicos representado na população 4 (CD14+CD16-CD11b+). No grupo de metastáticos verificaram-se 3 populações de monócitos clássicos representados pelas populações 5,6 e 7 (CD14+CD16-CD11b+), sendo a população 7 considerada como monócito clássico exausto (CD14+CD16lowCD11b+PD-L1+PD-L2+), ainda foram encontradas uma população de células dendríticas exaustas representada pela população 8 (CD14+CD16lowCD11c+PD-L1+PD-L2+), uma população de monócitos intermediários exaustos, em população 9 (CD14+CD16+CD11clowPD-L1+PD-L2+) e uma população de monócitos não clássicos representado em população 10 (CD14-CD16+CD11b+). Observa-se, nas duas figuras, nos pacientes metastáticos a predominância de populações exaustas, tanto em células linfocitárias quando de origem mieloides.

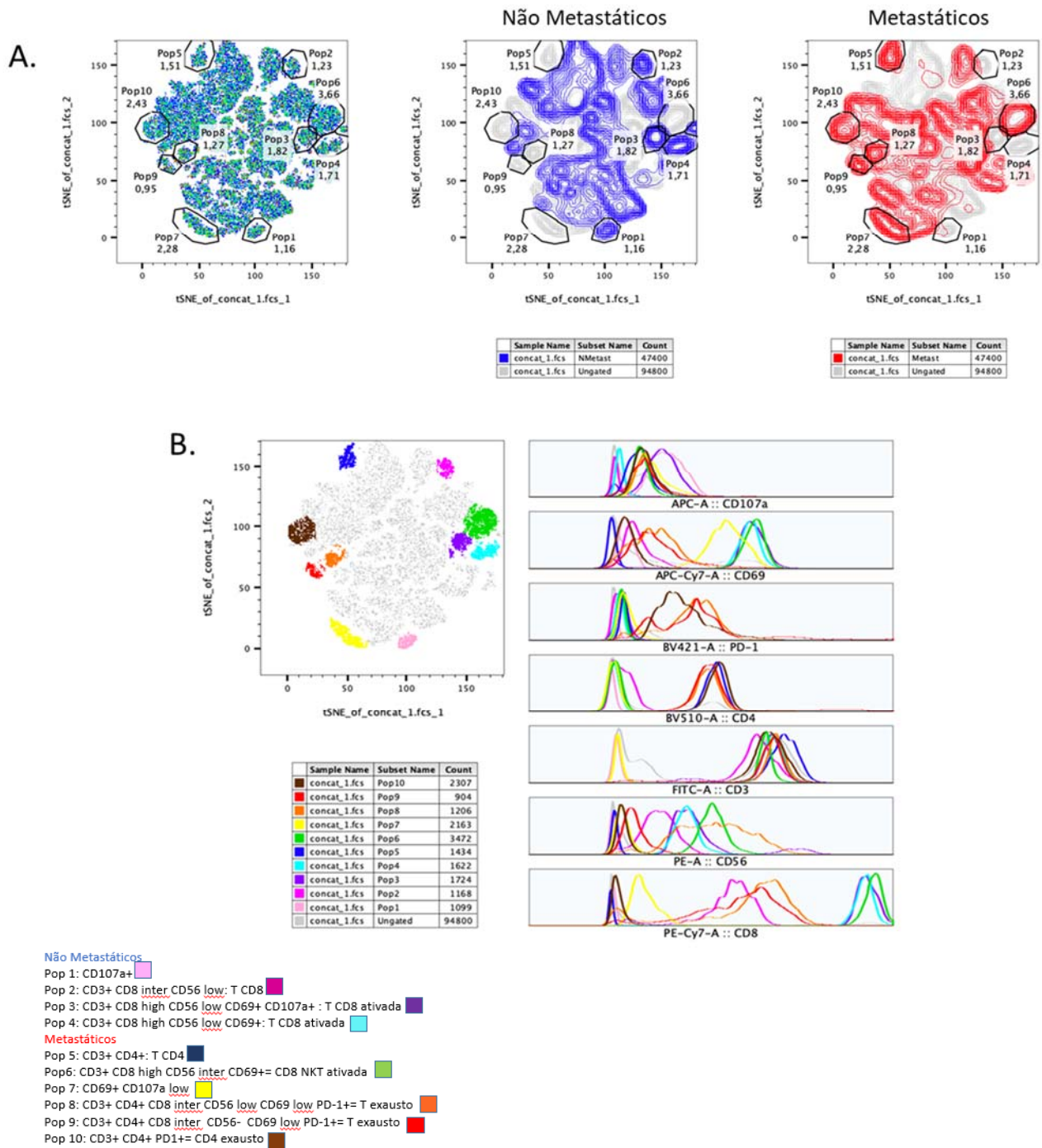


Figura 4 - Identificação de populações linfocitárias características de pacientes com doença metastática ou não metastática. Foram selecionados 6 pacientes metastáticos e 6 pacientes não metastáticos para clusterização de populações celulares utilizando TSNE. Foram selecionados apenas os eventos dentro do gate de linfócitos, considerando os parâmetros de tamanho e granulocidade. Subpopulações diferencialmente presentes nos grupos de pacientes metastáticos (vermelho) e não metastáticos (azul) (A). COLORMAP ou histogramas das populações previamente identificadas (B).

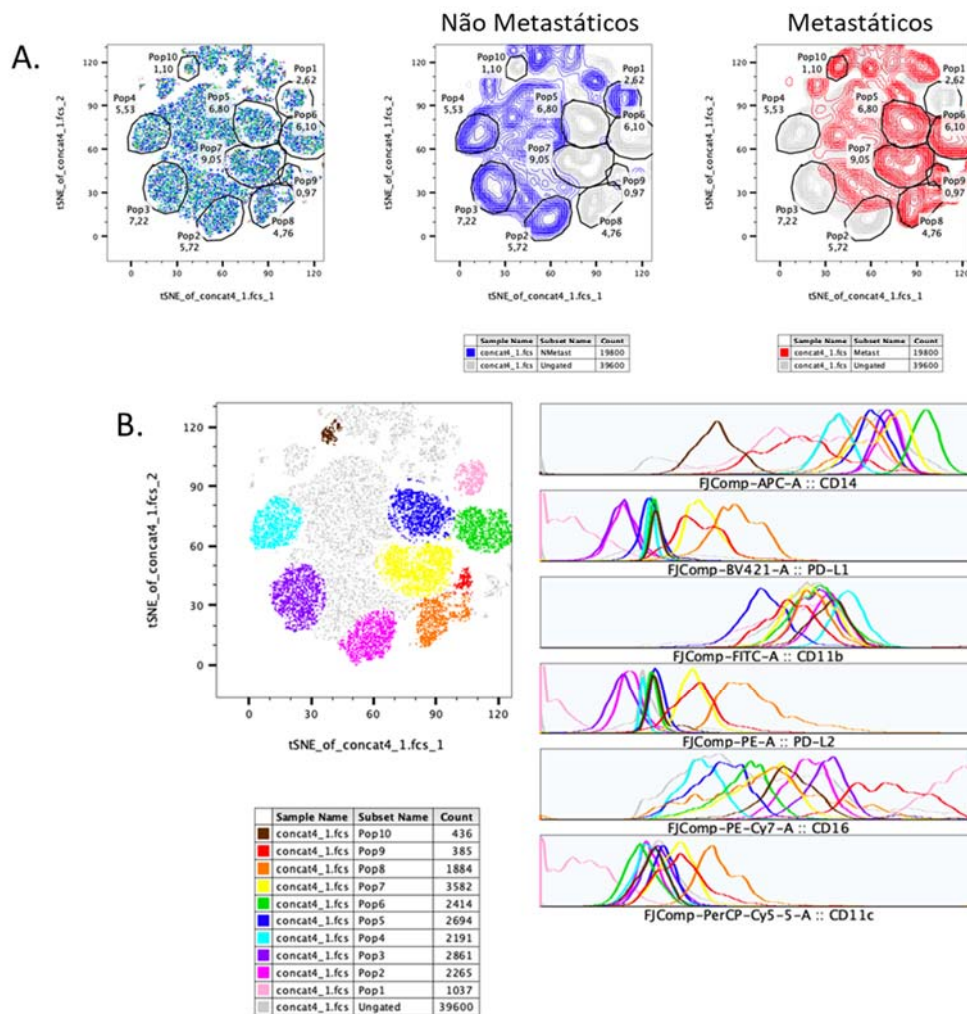


Figura 5 - Identificação de populações de origem mieloide características de pacientes com doença metastática ou não metastática. Foram selecionados 6 pacientes metastáticos e 6 pacientes não metastáticos para clusterização de populações celulares utilizando TSNE. Foram selecionados apenas os eventos dentro do gate de monócitos, considerando os parâmetros de tamanho e granulosidade. subpopulações diferencialmente presentes nos grupos de pacientes metastáticos (vermelho) e não metastáticos (azul) (A). COLORMAP ou histogramas das populações previamente identificadas (B).

5.3 CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES CELULARES IMUNES NO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES METASTÁTICOS E NÃO METASTÁTICOS

Nosso próximo passo foi avaliar a frequência das populações celulares imunes no sangue periférico de pacientes com CPNPC metastáticos ou não metastáticos, também por meio de citometria de fluxo, mas utilizando a análise manual com o auxílio do programa FlowJo,

para verificação das populações específicas de interesse, seguido por análise estatística. Na Figura 6. A podemos observar que a frequência de linfócitos T CD3 foi semelhante entre os dois grupos, bem como as populações de linfócitos T CD4 (Figura 6.B) e linfócitos T CD8 (Figura 6.C).

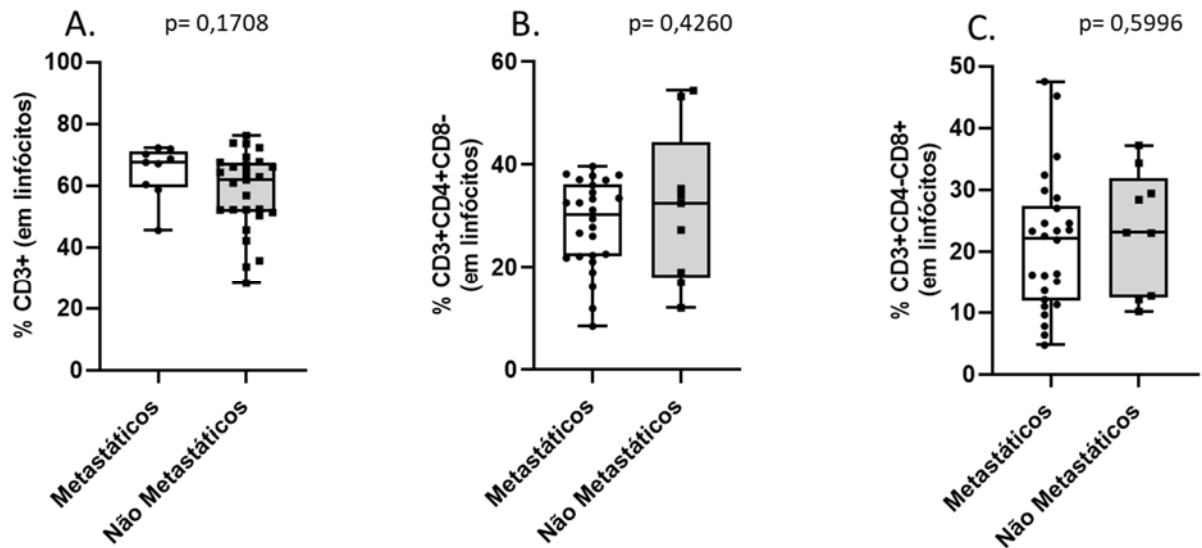


Figura 6 - Frequência de linfócitos T no sangue periférico de pacientes não metastáticos e metastáticos. Foram coletadas amostras de sangue periférico de pacientes com CPNPC virgens de tratamento e a frequência de populações imunes foi avaliada por citometria de fluxo. (A): linfócitos T CD3+. (B): linfócitos T CD4+ (CD3+CD4+CD8-) (C): linfócitos T CD8+ (CD3+CD4-CD8+).

Em seguida avaliamos a frequência de expressão do marcador de exaustão PD-1, em linfócitos T CD4+ (Figura 7.A) e linfócitos T CD8+ (Figura 7.D) bem como dos marcadores de ativação CD69 (figura 7.B em T CD4 e figura 7.E em T CD8) e CD107a (Figura 7.C em T CD4 e Figura 7.F em T CD8), e obtivemos resultados similares entre pacientes metastáticos e não metastáticos.

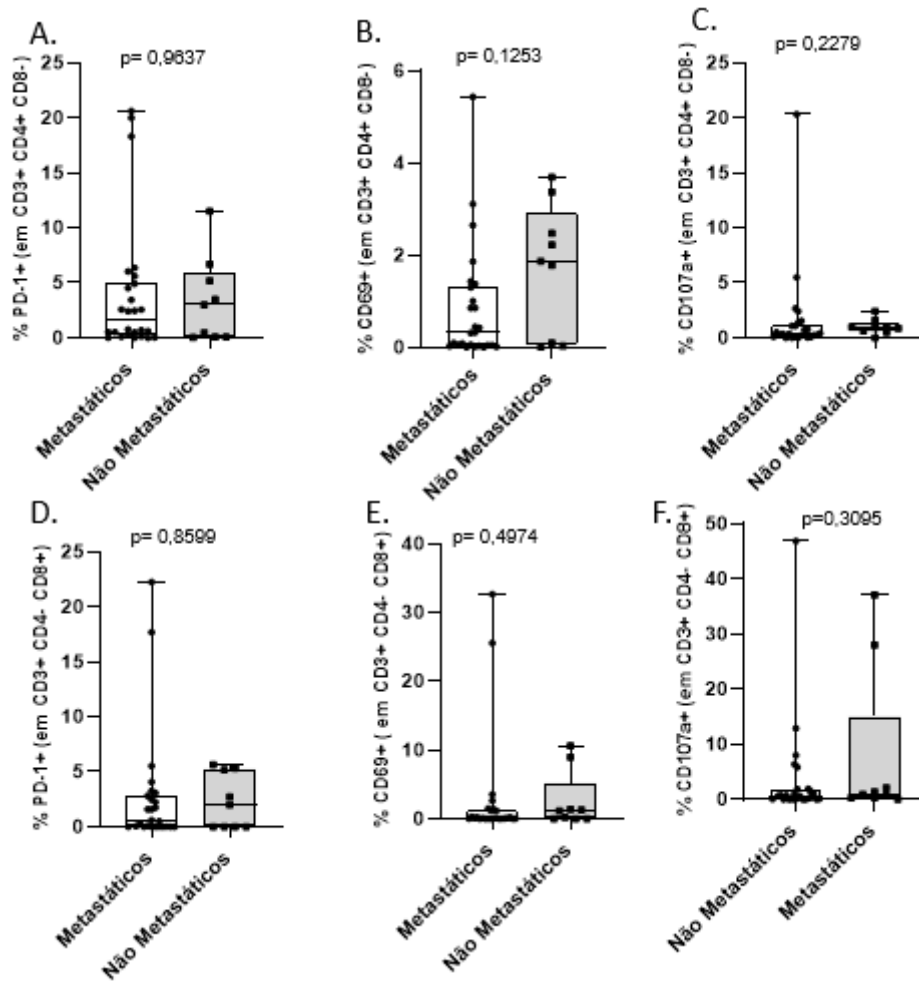


Figura 7 - Frequência de marcadores de ativação e exaustão em linfócito T CD4 e T CD8 no sangue periférico de pacientes não metastáticos e metastáticos. Foram coletadas amostras de sangue periférico de pacientes com CPNPC virgens de tratamento e a frequência de populações imunes foi avaliada por citometria de fluxo. linfócitos T CD4 E T CD8 expressando PD-1 (A E D, respectivamente), CD69 (B E E, respectivamente) ou CD107A (C E F, respectivamente).

Utilizando a mesma estratégia de análise, não encontramos diferenças significativas entre pacientes metastáticos e não metastáticos no que diz respeito à frequência de células NK, (Figura 8), NKT CD4 e NKT CD8 (Figura 9) bem como seus estados de ativação ou exaustão.

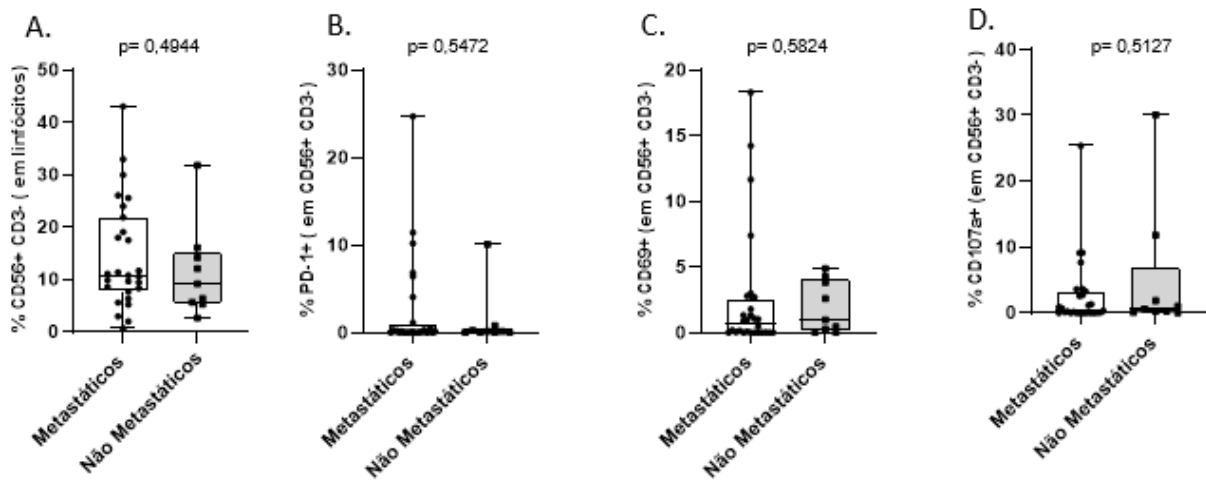


Figura 8 - Frequência de células natural Killer no sangue periférico de pacientes não metastáticos e metastáticos. Foram coletadas amostras de sangue periférico de pacientes com CPNPC virgens de tratamento e a frequência de populações imunes foi avaliada por citometria de fluxo. (A): células natural killer (CD3-CD56+). (B): células natural killer com marcador de exaustão PD-1 (CD56+CD3-PD-1+). (C): células natural killer com marcador de ativação CD69 (CD56+CD3-CD69+). (D): células natural killer com marcador de citotoxicidade CD107A (CD56+CD3-CD107A+).

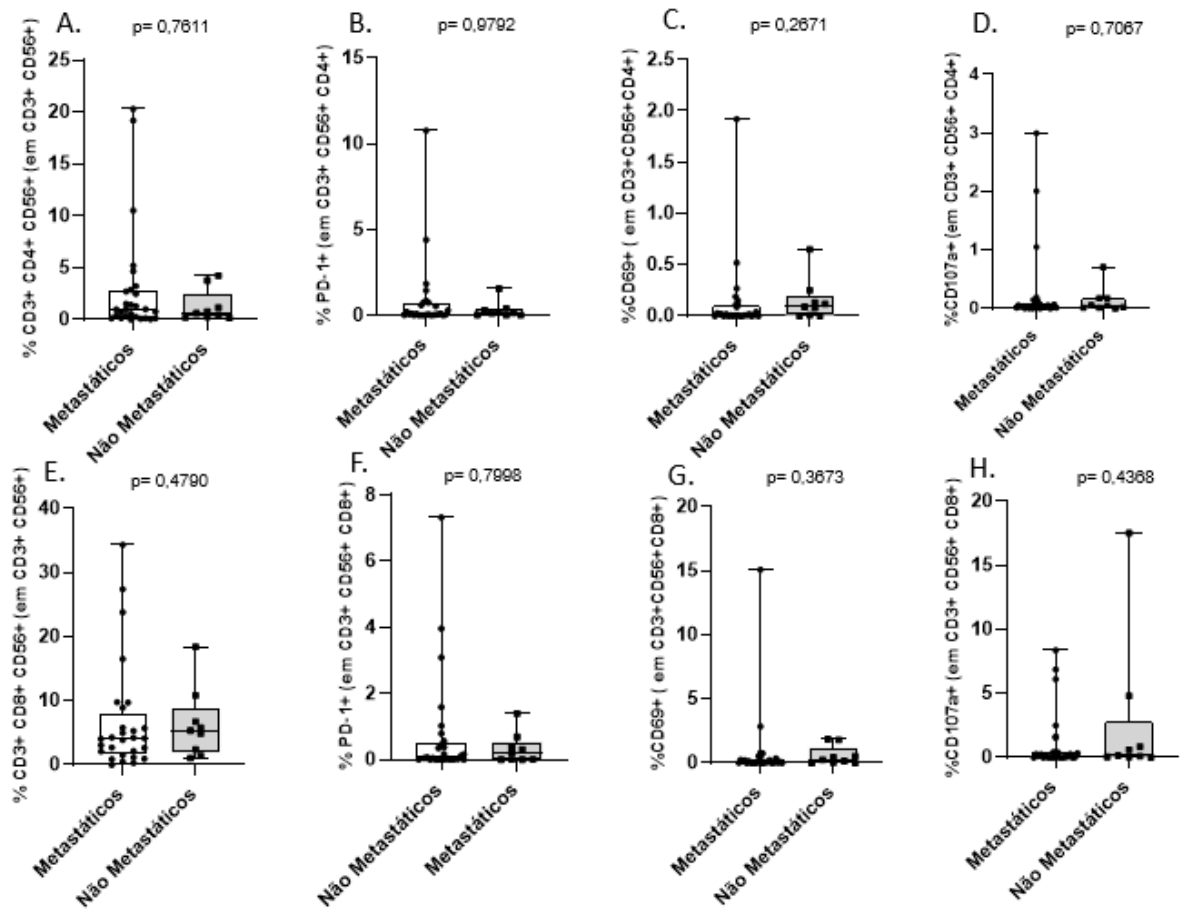


Figura 9 - Frequência de células NKT CD4 e NKT CD8 no sangue periférico de pacientes não metastáticos e metastáticos. Foram coletadas amostras de sangue periférico de pacientes com CPNPC virgens de tratamento e a frequência de populações imunes foi avaliada por citometria de fluxo. (A): células NKT CD4 (CD56+CD3+CD8+) (B): células NKT CD4+ com marcador de exaustão PD-1 (CD56+CD3+CD4+PD-1+). (C): células NKT CD4+ com marcador de ativação CD69 (CD56+CD3+CD4+CD69+). (D): células NKT CD4+ com marcador de ativação CD107A (CD56+CD3+CD4+CD107A+). (E): células NKT CD8 (CD56+CD3+CD8+) (F): células NKT CD8+ com marcador de exaustão PD-1 (CD56+CD3+CD8+PD-1+). (G): células NKT CD8+ Com marcador de ativação CD69 (CD56+CD3+CD8+CD69+). (H): células NKT CD8+ com marcador de ativação CD107A (CD56+CD3+CD8+CD107A+).

Também analisamos as frequências de linfócitos B (Figura 10.A), linfócitos B reguladores (Figura 10.B) e plasmócitos (Figura 10.C), mas também não encontramos diferenças significativas entre os grupos de pacientes analisados. No entanto obtivemos valores considerados próximos ao significativos ao compararmos linfócitos B de ambos os grupos (Figura 10.A, $p=0,0787$), indicando um aumento em pacientes metastáticos.

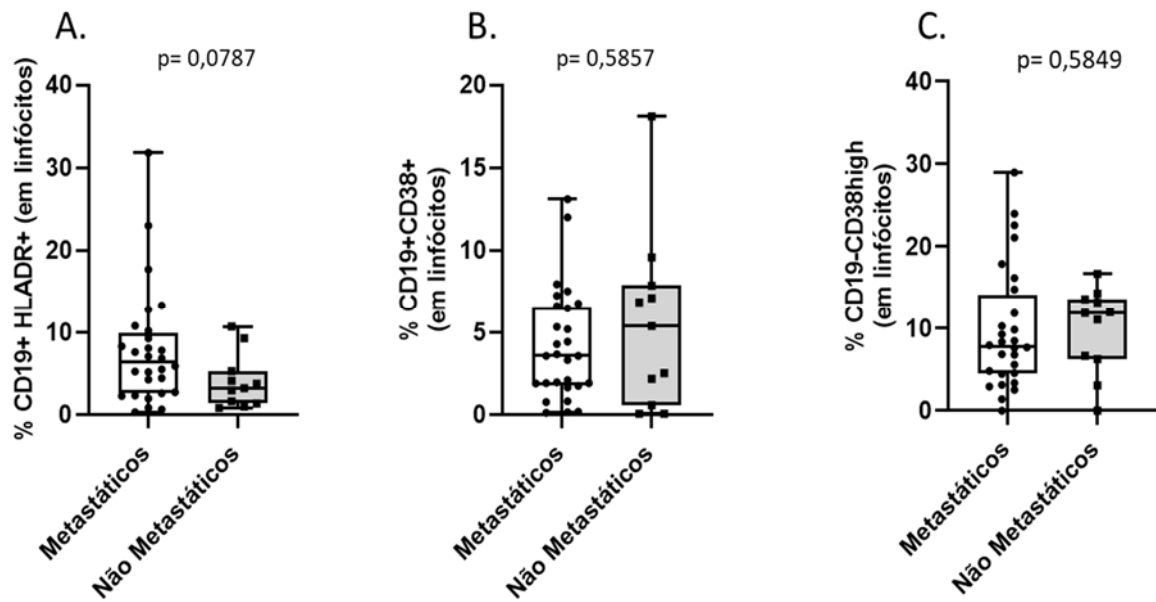


Figura 10 - Frequência de linfócitos B e plasmócitos no sangue periférico de pacientes não metastáticos e metastáticos. Foram coletadas amostras de sangue periférico de pacientes com CPNPC virgens de tratamento e a frequência de populações imunes foi avaliada por citometria de fluxo. (A): linfócitos B (CD19+HLADR+). (B): linfócitos B reguladores (CD19+CD38+). (C): plasmócitos (CD19-CD38 HIGH).

Prosseguimos nossas análises de populações imunes no sangue periférico de pacientes com doença metastática ou não metastática, e avaliamos as frequências de monócitos totais a partir dos parâmetros tamanho e granulosidade (Figura 11.A) e das subpopulações de monócitos clássicos (Figura 11.B), monócitos não clássicos (Figura 11.C), monócitos intermediários. (Figura 11.D), e células dendríticas (Figura 11. E) de acordo com maior ou menor expressão dos marcadores CD14 e CD16. Pudemos observar aumento entre monócitos totais e monócitos não clássicos em pacientes não metastáticos ($p= 0,0030$ e $p= 0,0008$, respectivamente). Além disso, conseguimos identificar um aumento de monócitos clássicos no grupo de pacientes metastáticos ($p=0,0256$). As subpopulações de monócitos também foram avaliadas em relação ao seu perfil associado à exaustão, utilizando os marcadores PD-L1 e PD-L2 (Figura 12). Com relação ao marcador PD-L2, não observamos nenhuma diferença significativa entre os monócitos clássicos (Figura 12.D), monócitos intermediários (Figura 12.E) e monócitos não clássicos (Figura 12.F). No entanto, vemos um aumento aproximado do significativo em PD-L2 em monócitos não clássicos no grupo de não metastáticos. Ao observar o marcador PD-L1, é possível identificar um aumento estatisticamente significativo em monócitos clássicos no grupo de metastáticos ($p= 0,0258$).

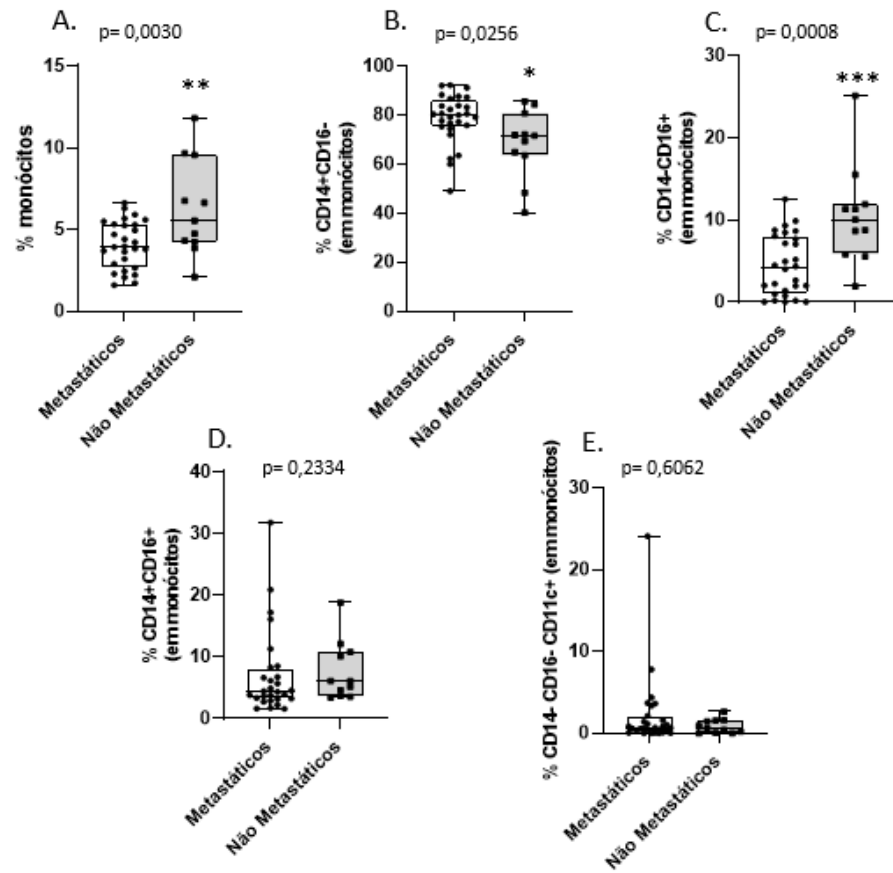


Figura 11 - Comparação de frequência de monócitos em sangue periférico entre grupos de pacientes não metastáticos e metastáticos por citometria de fluxo. (A): monócitos totais. (B): monócitos clássicos (CD14 +CD16-). (C): monócitos não clássicos (CD14-CD16+) (D): monócitos intermediários (CD14+ CD16+). (E): células dendríticas (CD14-CD16-CD11C+).

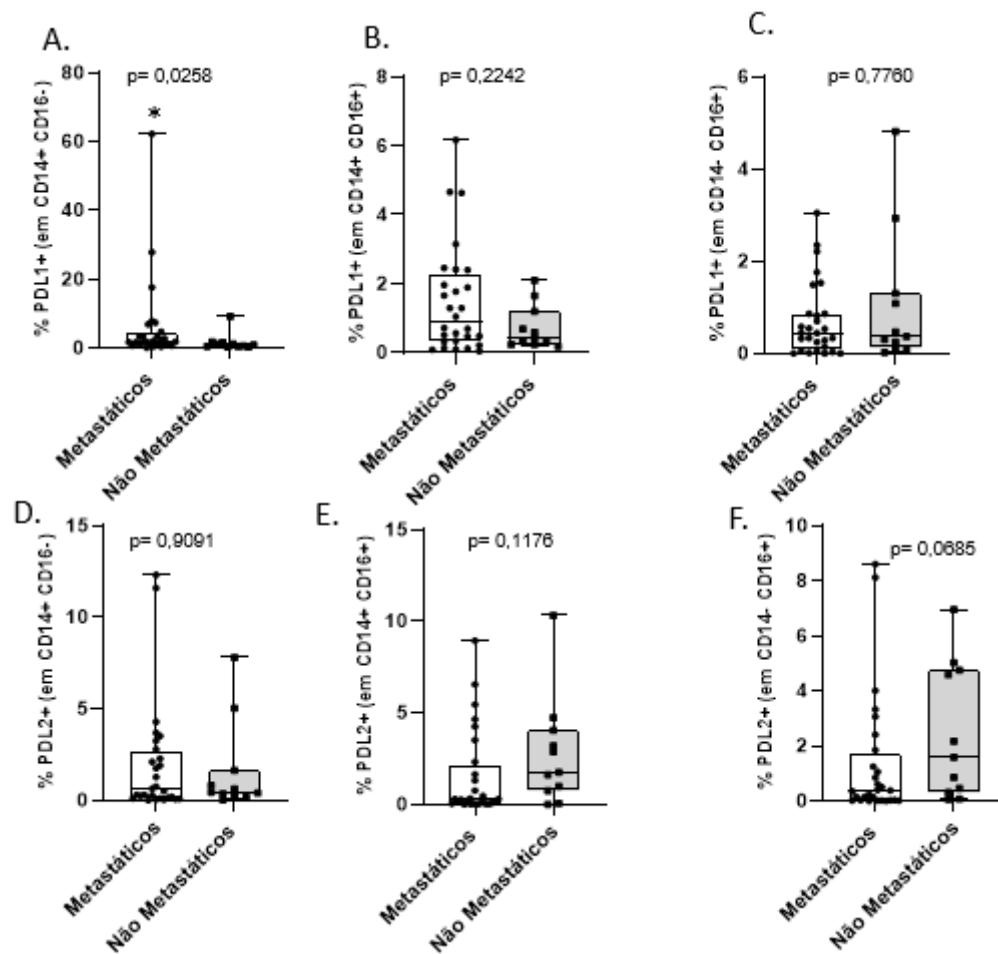


Figura 12 - Frequência de marcadores de exaustão PD-L1 E PD-L2 sobre subtipos de monócitos no sangue periférico de pacientes não metastáticos e metastáticos. Foram coletadas amostras de sangue periférico de pacientes com CPNPC virgens de tratamento e a frequência de populações imunes foi avaliada por citometria de fluxo. (A): marcador PD-L1 em monócitos clássicos (CD14+CD16-PD-L1+). (B): marcador PD-L1 em monócitos intermediários (CD14+CD16+PD-L1+). (C): marcador PD-L1 em monócitos não clássicos (CD14-CD16+ PDL1+). (D): marcador PD-L2 em monócitos clássicos (CD14+CD16-PD-L2+). (E): marcador PD-L2 em monócitos intermediários (CD14+CD16+PD-L2+). (F): marcador PD-L2 EM monócitos não clássicos (CD14-CD16+PDL2+).

5.4 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS

Para comparação dos dois grupos de pacientes em relação ao perfil imune solúvel, utilizamos a metodologia de ensaio multiplex, conforme descrito em material e métodos. Nós encontramos 2 citocinas significativamente aumentadas em pacientes com doença não metastática, quando comparados a pacientes com doença metastática (Figura 13), sendo elas: TRAIL (Figura 13A) ($p=0,0124$) e IL-1Ra (Figura 13.B) ($p=0,0303$). Além disso, também

encontramos 4 citocinas, eotaxina (Figura 14.A), IFN- α (Figura 14.B), MCP-3 (Figura 14.C) e IL-16 (Figura 14.D), que apesar de não ter poder estatístico de $p < 0,05$, parecem também estar em maiores concentrações em pacientes não metastáticos (Figura 14).

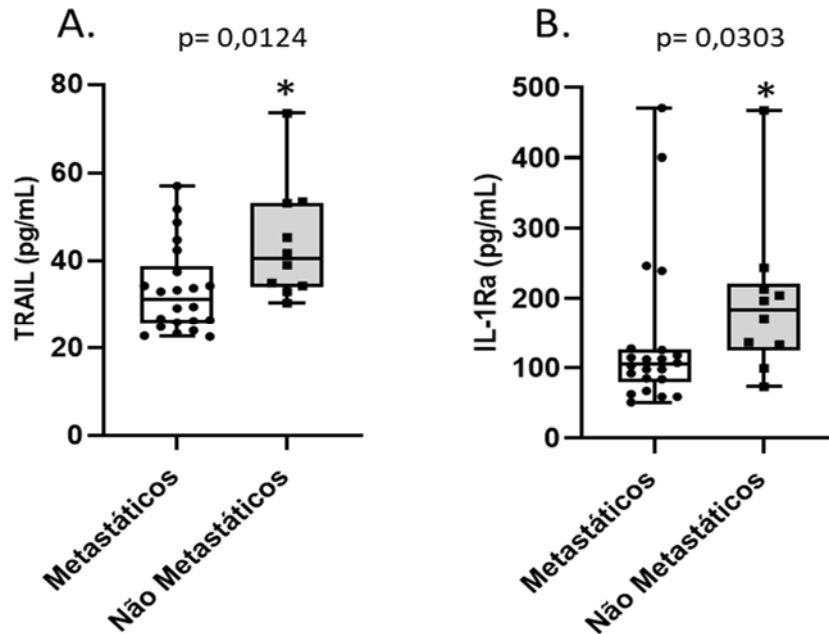


Figura 13 - Concentração de citocinas no plasma de pacientes com doença metastática ou não metastática. Foram coletadas amostras de sangue periférico de pacientes com CPNPC virgens de tratamento, separado o plasma, e a concentração de diversos analitos foi avaliada por bioplex. São mostradas as citocinas: (A): TRAIL. (B): IL-1RA.

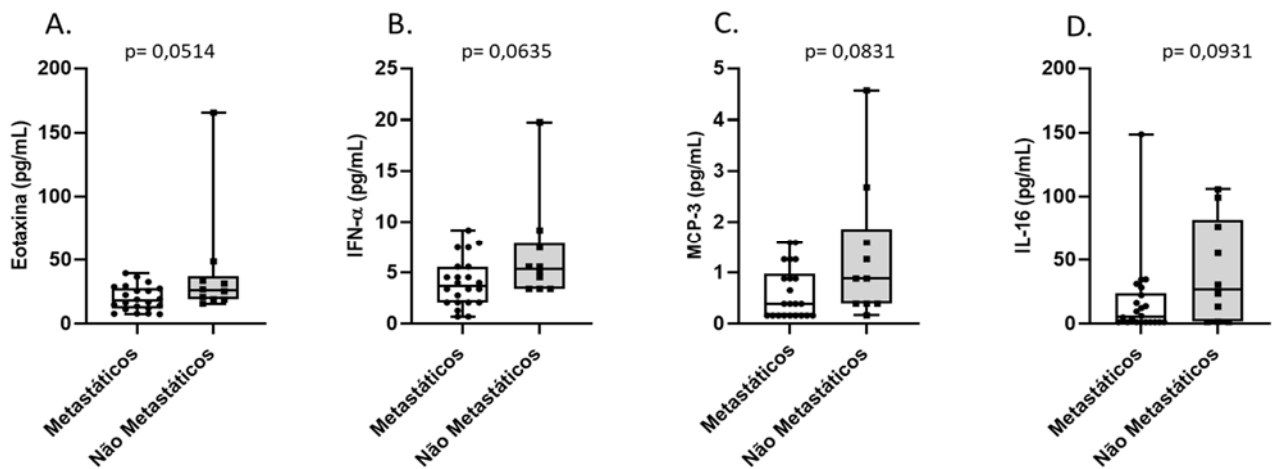


Figura 14 - Concentração de citocinas no plasma e comparação entre os pacientes não metastáticos e metastáticos. (A): Eotaxina. (B): IFN-A. (C): MCP-3. (D): IL-16.

5.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE PERFIL IMUNE E PERFIL CELULAR

Após avaliar os perfis imunes sistêmicos celular e solúvel individualmente, decidimos verificar se havia alguma correlação entre as concentrações das citocinas com p valor significativo ou com valores consideravelmente relevantes ao nosso estudo e as frequências de populações celulares presentes no sangue periférico dos pacientes.

Dentre várias correlações realizadas no grupo de pacientes não metastáticos, tanto entre citocinas e células imunes quanto entre citocinas, obtivemos alguns resultados interessantes. Percebemos que a citocina TRAIL estava relacionada com os linfócitos T CD8⁺ (Figura 15.A) no grupo não metastáticos, mas essa correlação não foi verificada no grupo de metastáticos (Figura 15.B). Também encontramos uma relação entre NKT CD8 e IFN- α novamente no grupo de não metastáticos (Figura 15.C) mas não no grupo de metastáticos (Figura 15.D).

Prosseguindo com as correlações, identificamos que MCP-3 se correlacionava com 3 populações celulares, onde tanto monócitos totais (Figura 16.E) quanto monócitos intermediários (Figura 16.C) demonstram correlações positivas e uma forte correlação negativa com linfócitos T CD3⁺ (Figura 16.A), correlações essas vistas também apenas no grupo de pacientes não metastáticos (Figura 16).

Ao verificarmos IL-16, observamos correlação com os linfócitos B (Figura 17.A) e com outra citocina, a IL-1ra (Figura 17.C), somente no grupo de não metastáticos.

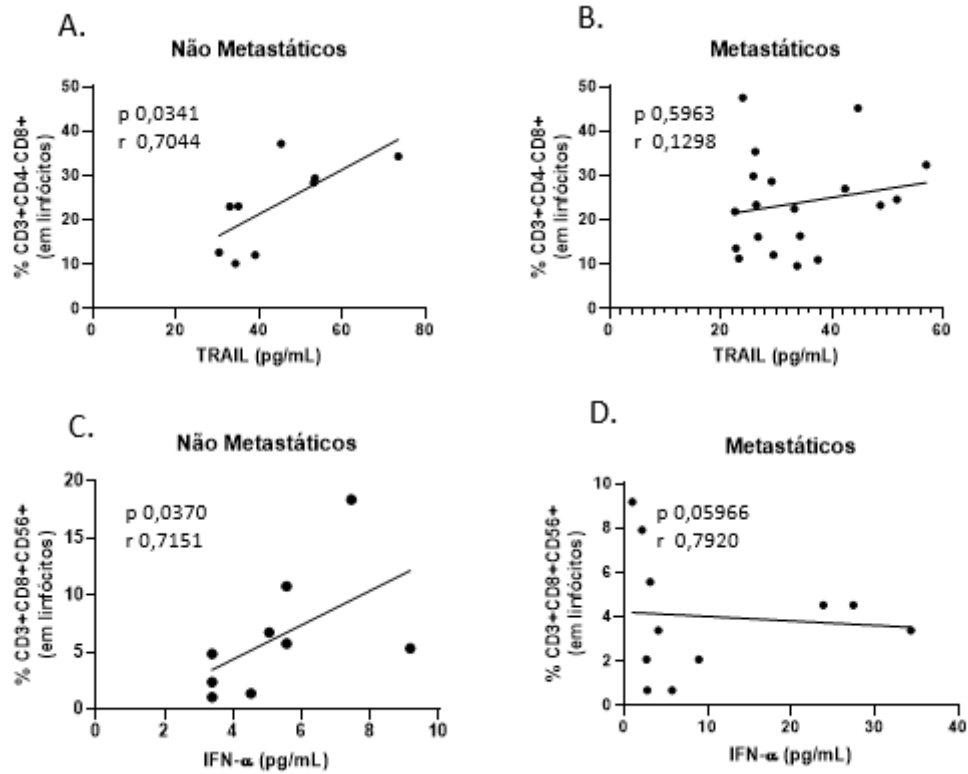


Figura 13 - Correlação entre as citocinas trail e IFN-A com as populações imunes de interesse.

(A): correlação de trail com linfócitos T CD8+ em não metastáticos. (B): correlação de trail com linfócitos T CD8+ em metastáticos. (C): correlação de IFN-A com NKT CD8 em não metastáticos. (D): correlação de IFN-A com NKT CD8 em não metastáticos.

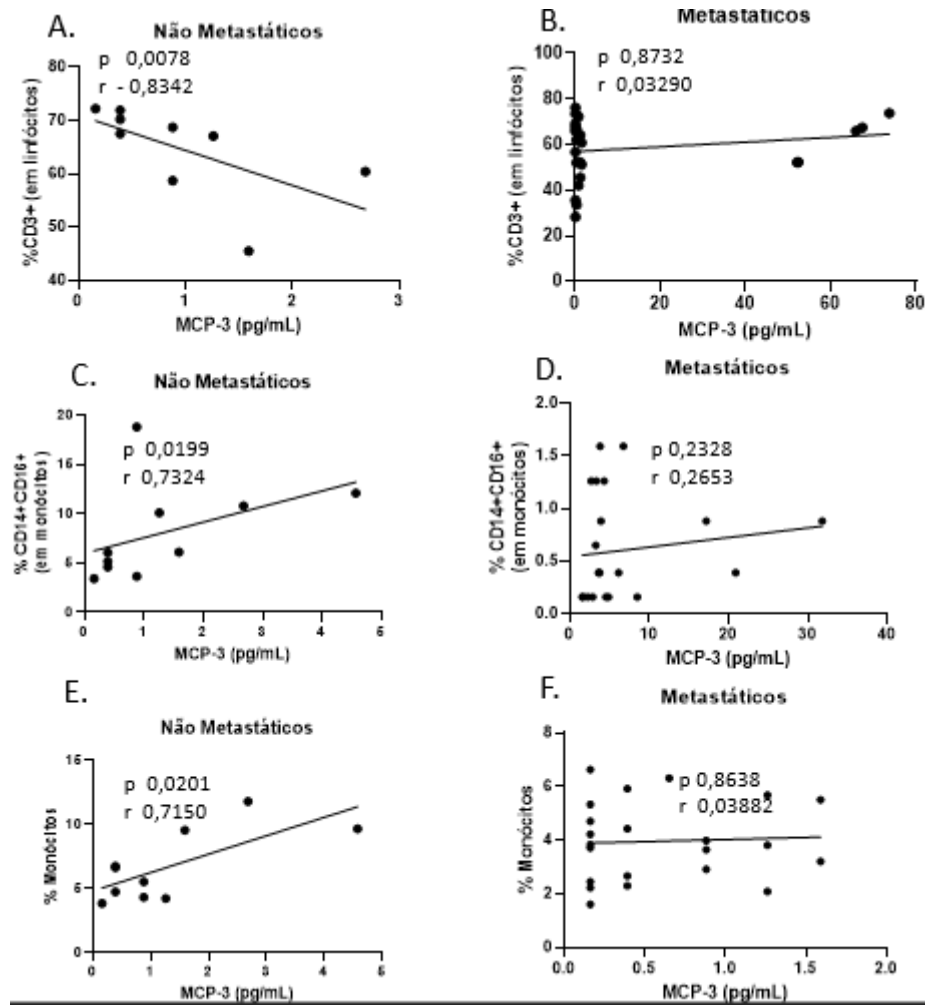


Figura 14 - Correlação entre a citocina MCP-3 com as populações imunes de interesse. (A): correlação de MCP3 com linfócitos T CD3+ em não metastáticos. (B): correlação de MCP-3 com linfócitos T CD3+ em metastáticos. (C): correlação de MCP-3 com monócitos intermediários em não metastáticos. (D): correlação de MCP-3 com monócitos intermediários em metastáticos.

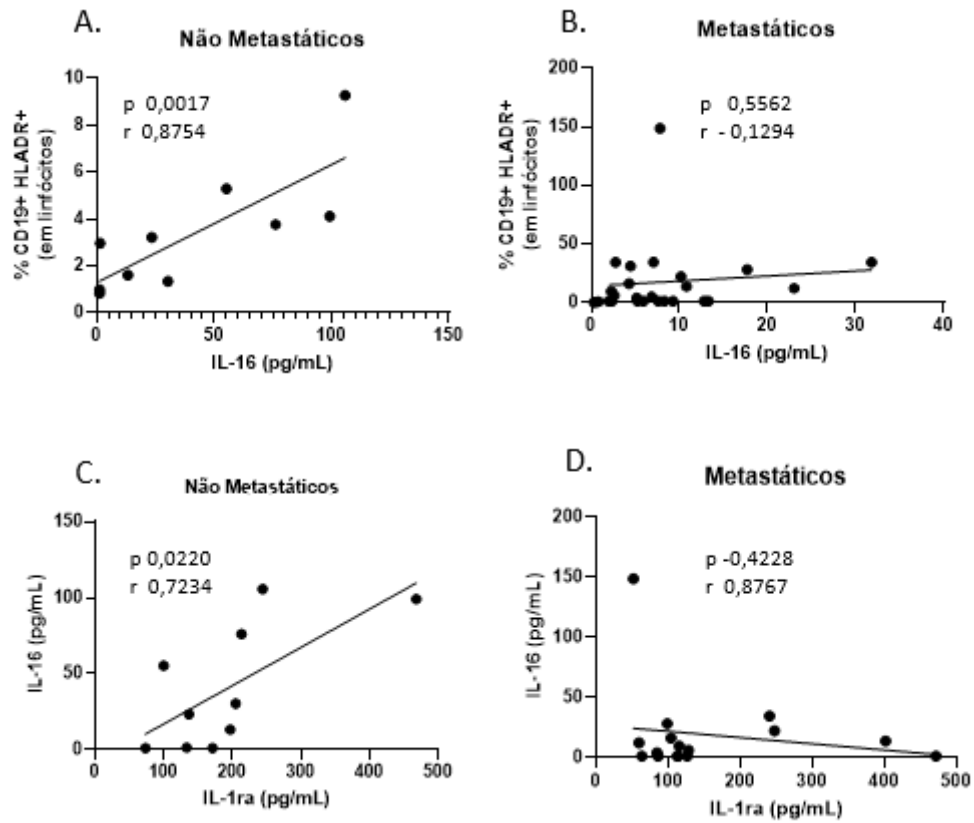


Figura 15 - Correlação da citocina IL-16 com as populações imunes de interesse e citocinas.

(A): correlação de IL-16 com linfócitos B em não metastáticos. (B): correlação de IL-16 com linfócitos B em metastáticos. (C): correlação de IL-16 com IL-1RA em não metastáticos. (D): correlação de IL-16 com IL-1RA em metastáticos.

6 DISCUSSÃO

O câncer de pulmão de não pequenas células é um dos cânceres com maior taxa de mortalidade não só no Brasil, mas no mundo todo. É uma doença considerada silenciosa pela falta de sintomas iniciais o que faz com que a doença seja detectada normalmente apenas em fase avançada.

Já se é conhecido que o microambiente tumoral, junto às células imunológicas e seus componentes, as citocinas e quimiocinas, possuem um papel importante para o desenvolvimento de metástases. No estágio metastático as células tumorais já conseguiram driblar o sistema imune e outros mecanismos de defesa do organismo e migraram, através da corrente sanguínea, para outros órgãos. A sobrevida tende a diminuir substancialmente entre os pacientes metastáticos, além de os tratamentos disponíveis não conseguirem ser bem sucedidos nesses mesmos pacientes. Para tanto, o conhecimento abrangente do microambiente tumoral e possíveis diferenças ou variações entre os tumores primários e metastáticos é muito relevante para que se consiga entender melhor como desencadeia a metástase e assim poder propor tratamentos mais eficazes ⁵¹.

Em nosso estudo encontramos diferenças no perfil imune celular e perfil imune solúvel ao comparar pacientes metastáticos e pacientes não metastáticos. No que diz respeito às populações linfocitárias e de origem mieloide verificadas através da ferramenta tSNE destacam-se populações celulares diferencialmente presentes nos dois grupos de pacientes. No grupo de não metastáticos as populações que se destacam são linfócitos T CD8 e T CD8 ativadas. Já é sabida a importância das células T CD8 no combate tumoral, já que elas são responsáveis, como dito na introdução, por induzirem a apoptose das células tumorais. O fato de termos encontrado células T CD8 ativadas justamente nos pacientes que ainda não se encontram em estágio metastático indicaria uma maior eficácia ao combate tumoral com maior peso das células imunes sobre a tumorigênese, em comparação aos pacientes metastáticos, uma vez que nesse grupo de pacientes prevaleceram-se populações exaustas não apenas de linfócitos T, mas também de células NKT CD8.

Para que uma célula T seja considerada exausta, ela deve chegar ao estado de disfunção celular e expressar altos níveis de receptores de inibição como o PD-1, entre outros receptores. Essa disfunção ocorre quando há uma exposição prolongada a antígenos o que acaba por causar a diminuição da função até a inativação das células T ^{52,53}. Já foi descrito que na fase metastática

as células cancerígenas se encontram mais resistentes à ação das células imunes, o que ocasiona o trabalho constante das células imune em geral, ou seja, a exposição prolongada a antígenos e consequentemente a exaustão das células T ⁵⁴.

Outra população encontrada entre os pacientes metastáticos foi a de linfócitos T CD4, que, conforme demonstrado por Turk e Guevara-Patino ⁵⁵, tendem a diminuir a atividade citotóxica de linfócitos T CD8, além disso demonstra que a mesma pode contribuir para o desenvolvimento de metástase ⁵⁵. Essas populações se apresentando no grupo de pacientes metastáticos podem indicar um estágio mais disfuncional do microambiente tumoral desses pacientes. Verificamos também uma população diferenciada de NKT CD8 no grupo de pacientes metastáticos, o que acabou sendo inesperado, já que a presença de células natural killer está envolvida com melhor prognóstico e por consequência, menor tendência a metástase ^{56,57}. Identificando as populações que se sobressaíram em ambos os grupos através da análise de tSNE gerou-se o questionamento a respeito da porcentagem celular no sangue das mesmas populações. Verificamos então por análise manual no FlowJo as porcentagens de linfócitos T, células NK e NKT e comparamos os grupos estatisticamente, porém não obtivemos nenhuma diferença significativa entre eles. Comparamos também se haveria diferenciação entre intensidade de ativação e exaustão das células estudadas e novamente não obtivemos diferença significativa comparando os dois grupos. É interessante ressaltar que a ausência de significância na comparação entre os grupos pode se dar por vários motivos, incluindo pequenas variações na definição dos gates entre a análise manual e a análise automatizada e o fato do tSNE ter sido realizado para um subgrupo menor de pacientes, podendo trazer algum viés de análise. Lembrando que os 12 pacientes analisados foram selecionados por serem os únicos avaliados com o mesmo painel de anticorpos por citometria de fluxo, sendo uma condição essencial para utilização da ferramenta de tSNE. Esses mesmos 12 pacientes também foram analisados separadamente em relação à seus dados demográficos, no entanto não verificou-se viés que os diferencia-se de maneira estatística com relação ao grupo como um todo.

Com relação às nossas análises das células de origem mieloide, novamente há o destaque de populações com perfil associado à exaustão no grupo dos pacientes metastáticos, reforçando o desequilíbrio no microambiente tumoral desse grupo. As populações com esse perfil foram monócitos clássicos, células dendríticas e monócitos intermediários. Já no grupo de pacientes não metastáticos observaram-se populações de monócitos intermediários e monócitos clássicos não associados com exaustão. Obtendo essas informações, novamente verificamos se haveria diferenciação entre as porcentagens de cada população, e observamos

um aumento significativo de monócitos totais e não clássicos entre o grupo de não metastáticos, além de aumento de monócitos clássicos entre o grupo de metastáticos.

Interessantemente é possível encontrar trabalhos que citam benefícios de monócitos não clássicos impedindo a evolução do tumor para o estágio de metástase. No trabalho de Hanna et al.⁵⁸, realizado com camundongos, é destacado que os “patrolling monocytes” ou monócitos patrulhadores, como é denominado os monócitos não clássicos, são ativamente recrutados pela via CXCR3-CXCL3 e estão mais envolvidos na resolução de inflamação e circulam na corrente sanguínea à procura de resquícios tumorais para que assim possam fagocitá-los, e que tais células também são responsáveis por recrutamento e ativação de células NK, levando assim a uma prevenção da metástase tumoral.

Diferentemente, os monócitos clássicos agiram de maneira oposta aos monócitos não clássicos, favorecendo o desenvolvimento metastático. No trabalho de Olingy et al.⁵⁹, também utilizando-se de camundongos, é demonstrado que os monócitos clássicos, também chamados de monócitos inflamatórios, utilizam-se de uma via diferente das dos monócitos não clássicos, a CCR2-CCL2 e que acabam promovendo extravasamento e sobrevivência das células tumorais, favorecendo assim o desenvolvimento de metástase.

Nossos achados então indicam que uma maior porcentagem de monócitos não clássicos no sangue de pacientes com câncer poderia indicar a ausência ou atraso de metástase e de maneira oposta, o aumento de monócitos clássicos em pacientes com câncer poderia indicar uma evolução para metástase.

Outro achado curioso ainda nas populações de monócitos diz respeito ao grupo de pacientes metastáticos e mais uma vez sua ligação com perfil de exaustão, onde encontramos aumento de PD-L1 justamente nos monócitos clássicos. Esses achados reforçam a presença de maior desregulação de células imunes ao chegar a estágios mais avançados da doença, diferenciando bem o microambiente metastático do não metastático.

Nós também avaliamos as frequências dos linfócitos B bem como suas subpopulações de plasmócitos e B reguladoras, não obtendo diferença significativa entre os grupos estudados. No entanto, verificamos um aumento aproximado do valor significativo em linfócitos B em pacientes metastáticos, o que poderia associar linfócitos B com um pior prognóstico da doença, como anteriormente visto em muitos trabalhos. Os linfócitos B podem ser prejudiciais levando à carcinogênese, mas essa função prejudicial dependeria dos subtipos de linfócitos e às diferentes vias utilizadas para seu recrutamento³⁶. Em um estudo publicado em 2011, utilizando camundongos, a presença das células B no microambiente tumoral estimula a progressão das células tumorais levando à metástase⁶⁰. Outro estudo publicado nestes anos, também utilizando

camundongos, demonstrou que o recrutamento de linfócitos B para microambiente tumoral de pacientes com carcinoma renal tende a aumentar a capacidade metastática e invasiva nesse tipo de câncer ⁶¹.

Tendo concluído as análises do perfil imune celular, partimos para observações e comparações do perfil imune solúvel que pudessem mais uma vez demonstrar possíveis diferenças entre os nossos dois grupos de pacientes. Ao comparamos 48 diferentes citocinas entre nossos pacientes percebemos que duas delas, a TRAIL e a IL-1Ra se encontraram significativamente aumentadas entre os pacientes não metastático. Essas duas citocinas já vêm sendo citadas em trabalhos como auxiliadoras ao combate da carcinogênese. Tanto é que TRAIL (tumor necrosis fator related apoptosis inducing ligand), já a alguns anos vêm sendo estudada como opção terapêutica para o tratamento do câncer, não só por sua atividade contra o tumor, mas também pelo fato de não obter nenhuma ou baixíssima toxicidade ^{62,63}. O fato de termos encontrado TRAIL aumentado no plasma justamente em pacientes não metastáticos demonstra um melhor funcionamento do sistema imune nesse grupo de pacientes, indicando um combate tumoral mais eficaz e um equilíbrio ainda eficiente, com homeostase no microambiente tumoral. Para reforçar nossos achados, também encontramos IL-1Ra aumentada nesse mesmo grupo de pacientes. IL-1Ra é um receptor antagonico de IL-1, uma interleucina fortemente relacionada à progressão tumoral e a um mal prognóstico, já que sua expressão tende a interferir no bom funcionamento das células T CD8 e em sua secreção de IFN- α . A presença e conseqüentemente a ligação de IL-1Ra com IL-1 causa a inibição dessa função tumorigênica de IL-1, atenuando a invasão e angiogênese tumoral ^{64,65,66}. Tanto TRAIL quanto IL-1 Ra podem estar favorecendo esses pacientes, atrasando a progressão do tumor. Ambas as citocinas poderiam ser fortes candidatas a biomarcadores para pacientes que poderão desenvolver metástase mais tardiamente, mas que no momento não se encontram nesse estágio.

Não obstante, ainda nesse mesmo grupo de pacientes foi possível ver um aumento com valores de p próximos do significativo para mais quatro citocinas: MCP-3, IL-16, IFN- α e eotaxina. Todas essas citocinas já foram anteriormente citadas em inúmeros trabalhos relacionados a resposta imune tumoral, tanto para progressão tumoral quanto com ação anti-tumorigênica.

A eotaxina, ou CCL11, como também é denominada, é uma quimiocina envolvida no recrutamento de células inflamatórias como eosinófilos e neutrófilos, e possui grande relação com doenças inflamatórias. No câncer costuma ter forte ligação com a progressão tumoral, auxiliando a célula cancerígena em sua evasão e migração celular. Essa função foi citada em diversos artigos relacionados a cânceres de próstata, ovário e câncer colorretal ^{67,68,69}.

MCP-3 (monocytes chemoattractive protein) ou CCL7, também é uma quimiocina citada por seu envolvimento com recrutamento tumoral e metástase. Com ação em diversas células imunes, não somente nos monócitos, mas também em células NK, basófilos, eosinófilos e neutrófilos. Assim como a eotaxina, MCP-3 pode estar relacionada à promoção e progressão do tumor, sendo também amplamente produzida pelas próprias células do tumor, e tende a regular a secreção de protease por macrófagos. Em outros trabalhos, porém, essa mesma citocina vem sendo caracterizada com a desaceleração do crescimento de câncer cervical, por induzir a infiltração leucocitária no sítio tumoral ^{70,71,72,73}.

A alta expressão de IL-16, como demonstrado em trabalhos anteriores, está envolvida em tumores como mieloma, glioma, tumores de ovário e em câncer gástrico. É uma interleucina envolvida com diversas células imunes como linfócitos T CD8 e linfócitos B. Sua ligação ao receptor de linfócitos T CD4 também é bastante citada, por ativar macrófagos, células T, monócitos, células dendríticas e eosinófilos. Possui envolvimento na secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL-1 β e IL-6 ^{74,75,76}.

Já IFN- α é uma citocina amplamente conhecida e utilizada em tratamentos contra o câncer em camundongos, sendo responsável por gerar uma resposta antitumoral duradoura quando administrada junto a outros tratamentos. Há trabalhos citando esse tratamento não só para cânceres de pulmão, mas também em outros tipos de cânceres. Sua atividade no microambiente tumoral está relacionada a células T e células dendríticas ^{77,78,79}.

Através dos resultados obtidos com essas 6 citocinas, decidimos correlacionar tanto as citocinas entre si quanto com as células imunes analisadas no estudo. Todas as correlações significativas foram encontradas apenas no grupo de pacientes não metastáticos, já que foi apenas nesse grupo que encontramos aumento dos níveis de citocinas.

Primeiramente analisamos TRAIL tanto com os linfócitos quanto com as células de origem mieloide. Também verificamos se poderia existir alguma correlação dela com as citocinas envolvidas no estudo. A única correlação significativa foi em relação aos linfócitos T CD8. Apesar de não observamos um aumento significativo da frequência de linfócitos T CD8 no sangue de pacientes não metastáticos, é sabido que tanto TRAIL quanto linfócitos T CD8 possuem ação anti-tumoral, o que, novamente, indica um benefício para o grupo de pacientes não metastáticos. Receptores de TRAIL já foram identificados na superfície de células T CD8, relacionando-os com uma possível interferência na atividade citotóxica de linfócitos T CD8. Em outro estudo é demonstrado uma contribuição ativa de TRAIL na indução de apoptose de células tumorais, podendo regular, de maneira periférica, a resposta citotóxica de T CD8, indicando que a expressão de TRAIL em células T intensificam sua função contra o tumor ^{80,81}.

As citocinas IL-1Ra, IL-16, eotaxina, INF- α e MCP-3 foram verificadas da mesma maneira que TRAIL e de maneira significativa, todas, com exceção de eotaxina obtiveram uma ou mais correlações com células e/ou citocinas. IL-16 correlacionou-se significativamente a dois parâmetros em pacientes não metastáticos: com IL-1Ra e também com os linfócitos B. A associação de linfócitos B com IL-16 já foi comentada em um artigo publicado em 2000. Nesse trabalho é demonstrado que linfócitos B possuem a capacidade de sintetizar IL-16 induzindo a migração de linfócitos T CD4 e monócitos precursoras de células dendríticas. A neutralização de IL-16 demonstrou inibir *in vitro* a migração de tais células. Em outro trabalho publicado em 2013, é visto que a presença de pró-IL-16 em linfócitos B não ativados tende a regular a proliferação dessas células por possuírem efeito importante no ciclo celular, interferindo assim na proliferação celular ^{60,82}.

A correlação vista entre IL-1Ra e a citocina IL-16 não foi demonstrada em trabalhos anteriores. IL-1Ra como já mencionado, tende a apresentar uma desaceleração metastática para o paciente, evitando a ação de IL-1. Mais investigações a respeito de ambas as citocinas pode ser interessante para descobrirmos a relação entre elas.

Outro achado em nosso estudo diz respeito à MCP-3 junto a monócitos totais e monócitos intermediários. Já é bem descrito a importância de MCP-3 no recrutamento de monócitos, em especial os monócitos inflamatórios através do receptor CCR2. Além dessa função, MCP-3 também está associada à produção de citocinas inflamatórias no microambiente tumoral ou em tecidos infectados. Em um artigo de revisão de 2019 é demonstrado a dualidade a respeito da função dos monócitos em tumores, onde é citada a função tanto pró tumorigênica quanto antitumoral, e que o fenótipo do monócito teria grande influência, como já descrevemos e pudemos observar em nossas análises. Há ainda o debate se há ou não a transformação de monócitos clássicos em monócitos intermediários, terminando em monócitos não clássicos e nesse caso é discutido que apesar de existir essa modificação fenotípica entre alguns monócitos, outros não passariam por tal transformação, sendo diretamente diferenciados e, monócito não clássicos. Apesar de não observarmos aumento da frequência de monócitos clássicos em nenhum grupo observado, verificamos que nos pacientes metastáticos há monócitos mais exaustos, com maior expressão de PD-L1.

Ainda sobre MCP-3 observamos uma correlação negativa para células T CD3. No mesmo trabalho citado anteriormente, discutiu-se que o recrutamento de monócitos poderia ter uma associação negativa com infiltração de células T ^{83,59}.

Finalmente, observamos uma correlação positiva entre IFN- α e as células NKT CD8. Ambas são amplamente associadas a um melhor prognóstico em diversos tipos de cânceres ⁷⁶.

Os resultados de nosso trabalho, resumidos na Figura 18, indicam maior concentração de citocinas em circulação de pacientes não metastáticos, em especial citocinas com função anti-tumoral importante como TRAIL e IL-1Ra. Além das citocinas, demonstramos também que células mieloides com função protetora para o paciente, como monócitos não clássicos tendem a estar elevadas nesse mesmo grupo de pacientes. Em contrapartida, células mieloides com função pró- tumoral são encontradas em aumento em pacientes metastáticos como monócitos clássicos. Apesar de ainda não avaliarmos uma correlação do perfil sistêmico com o microambiente tumoral neste grupo de pacientes, o fato de verificarmos essas diferenças a partir de marcadores sistêmicos (facilmente avaliados por técnicas muito pouco invasivas) entre esses dois grupos de pacientes é muito útil para melhor entender o processo e sugerir biomarcadores relacionados à metástase, propondo assim novas estratégias de seguimento e novas abordagens terapêuticas.

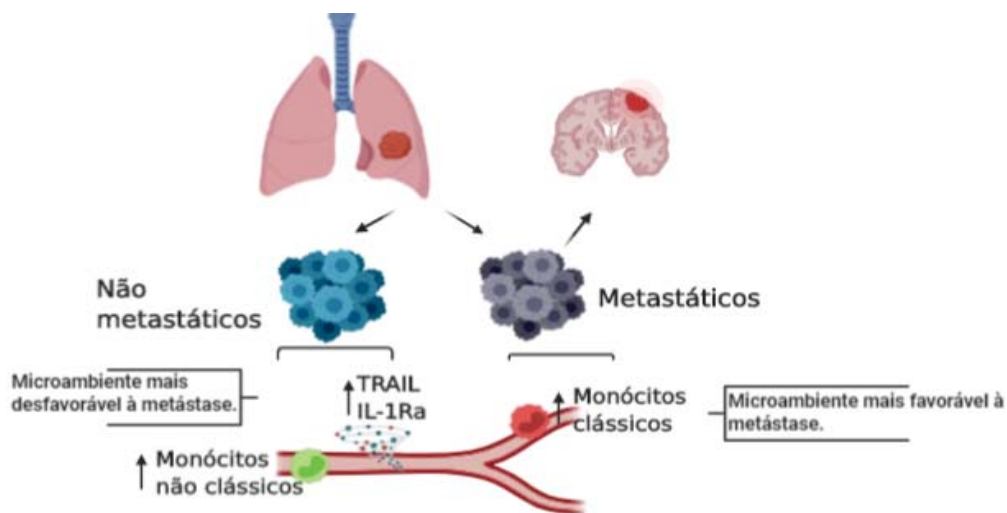


Figura 18 - Mecanismos imunes associados ao desenvolvimento de metástase em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células.

7 CONCLUSÃO

Nosso trabalho demonstra claramente alterações do perfil imune em pacientes metastáticos e não metastáticos. Encontramos três possíveis biomarcadores, TRAIL, IL1-Ra e monócitos não clássicos, associados a pacientes que ainda não desenvolveram metástase, podendo indicar maior proteção contra o tumor. Também encontramos um biomarcador inflamatório em pacientes metastáticos, que são os monócitos clássicos, célula bem envolvida com a progressão tumoral. Assim, sugerimos marcadores sistêmicos facilmente avaliados por técnicas pouco invasivas e que poderiam sugerir ou indicar a presença de metástase em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células.

8 REFERÊNCIAS

1. Lorusso G, Rüegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol.* 2008;130(6):1091–103.
2. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gome da Silva. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2019.
3. Perez-Moreno P, Brambilla E, Thomas R, Soria JC. Squamous cell carcinoma of the lung: Molecular subtypes and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res.* 2012;18(9):2443–51.
4. Huang T, Li J, Zhang C, Hong Q, Jiang D, Ye M, et al. Distinguishing lung adenocarcinoma from lung squamous cell carcinoma by two hypomethylated and three hypermethylated genes: a meta-analysis. *PLoS One.* 2016;11(2):1–13.
5. Almeida SE, Silva P, Menino GC, Silva F. Fenologia de *Hancornia speciosa* (Apocunaceae) em Montes Claros de Goiás, Brasil. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia.* 2018;15(27):8-18.
6. Zheng M. Classification and pathology of lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2016;25(3):447–68.
7. Vieira V, Cruz V, Soares N, Faquim R, Araújo E. Câncer de pulmão de não pequenas células. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia.* 2017;14(25):1512-32.
8. Franceschini J, Jardim JR, Luisa A, Fernandes G, Jamnik S, Santoro IL. Relação entre a magnitude de sintomas e a qualidade de vida: análise de agrupamentos de pacientes com câncer de pulmão no Brasil. *J Bras Pneumol.* 2013;39(1):23–31.
9. Testa U, Castelli G, Pelosi E. Lung cancers: Molecular characterization, clonal heterogeneity and evolution, and cancer stem cells. *Cancers (Basel).* 2018;10(8):1–81.
10. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(5):584–94.
11. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;140(6):883–99.
12. Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung: Preliminary report. *Bull World Health Organ.* 1999;77(1):84–93.

13. Reck M, Popat S, Reinmuth N, De Ruyscher D, Kerr KM, Peters S. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014;25(May 2014):iii27–39.
14. Duarte RL, Paschoal ME. Molecular markers in lung cancer: prognostic role and relationship to smoking. *J Bras Pneumol*. 2005 Jan-Feb;32(1):56–61.
15. Marrone KA, Forde PM. Cancer immunotherapy in older patients. *Cancer J (United States)*. 2017;23(4):219–22.
16. Vitale I, Manic G, Coussens LM, Kroemer G, Galluzzi L. Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Cell Metab*. 2019;30(1):36–50.
17. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar;144(5):646–74.
18. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*. 2017;7(5):1016–36.
19. Lopes GL, Vattimo EFQ, de Castro Junior G. Identifying activating mutations in the EGFR gene: prognostic and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. *J Bras Pneumol*. 2015;41(4):365–75.
20. Liu X, Wang P, Zhang C, Ma Z. Epidermal growth factor receptor (EGFR): A rising star in the era of precision medicine of lung cancer. *Oncotarget*. 2017;8(30):50209–20.
21. Pinheiro G, Pereira T, Dias C, Freitas C, Hespanhol V, Costa JL, et al. Identifying relationships between imaging phenotypes and lung cancer-related mutation status: EGFR and KRAS. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–9.
22. Ferrer I, Zugazagoitia J, Herbertz S, John W, Paz-Ares L, Schmid-Bindert G. KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy. *Lung Cancer*. 2018;124(January):53–64.
23. Fett-Cont A, Salles A. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2002;24(2):85–9.
24. Altorki NK, Markowitz GJ, Gao D, Port JL, Saxena A, Stiles B, et al. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(1):9–31.
25. Chammas R. Câncer e o microambiente tumoral Cancer and the tumor microenvironment. *Rev Med (Puebla)*. 2010;89(1):21–31.
26. Wang JJ, Lei KF, Han F. Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(12):3855–64.

27. Wagner M, Koyasu S. Cancer immunoediting by innate lymphoid cells. *Trends Immunol.* 2019;40(5):415–30.
28. Kambayashi T, Laufer TM. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: Can anything replace a dendritic cell? *Nat Rev Immunol.* 2014;14(11):719–30.
29. McIntire RH, Hunt JS. Antigen presenting cells and HLA-G: a review. *Placenta.* 2005 Apr;26 Suppl A:S104-9.
30. Constantino J, Gomes C, Falcão A, Neves BM, Cruz MT. Dendritic cell-based immunotherapy: a basic review and recent advances. *Immunol Res.* 2017;65(4):798–810.
31. Chen X, Bode AM, Dong Z, Cao Y. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) is regulated by oncoviruses in cancer. *FASEB J.* 2016 Sep;30(9):3001-10.
32. Perreaul C. Mechanisms and implications of immunodominance in CD8⁺ T-cell responses. In: Medin J, Fowler D. *Experimental and applied immunotherapy.* New York: Springer; 2011. p.195-206.
33. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity.* 2014;41(1):49–61.
34. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel).* 2014;6(3):1670–90.
35. Yuen GJ, Demissie E, Pillai S. B lymphocytes and cancer: a love–hate relationship. *Trends Cancer.* 2016;2(12):747–57.
36. de Charette M, Marabelle A, Houot R. Turning tumour cells into antigen presenting cells: The next step to improve cancer immunotherapy? *Eur J Cancer.* 2016;68:134–47.
37. Wu J, Lanier LL. Natural Killer Cells and Cancer. *Adv Cancer Res.* 2003;90:127–56.
38. Böttcher JP, Bonavita E, Chakravarty P, Blees H, Cabeza-Cabrerizo M, Sammicheli S, et al. NK cells stimulate recruitment of cDC1 into the tumor microenvironment promoting cancer immune control. *Cell.* 2018;172(5):1022-1037.e14.
39. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.* 2016 Dec;17(12):e542-e551.
40. Iwahori K, Shintani Y, Funaki S, Yamamoto Y, Matsumoto M, Yoshida T, et al. Peripheral T cell cytotoxicity predicts T cell function in the tumor microenvironment. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–12.
41. Maimela NR, Liu S, Zhang Y. Fates of CD8⁺ T cells in tumor microenvironment. *Comput Struct Biotechnol J.* 2019;17:1–13.

42. Im SJ, Hashimoto M, Gerner MY, Lee J, Kissick HT, Burger MC, et al. Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature*. 2016;537(7620):417–21.
43. Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int Immunol*. 2016;28(8):401–9.
44. Borst J, Ahrends T, Bąbała N, Melief CJM, Kastenmüller W. CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(10):635–47.
45. Tanaka A, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res*. 2017;27(1):109–18.
46. Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, Aslani S, Alimardani M, Pasdar A, et al. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol*. 2019;234(10):16824–37.
47. Stucci S, Palmirotta R, Passarelli A, Silvestris E, Argentiero A, Lanotte L, et al. Immune-related adverse events during anticancer immunotherapy: Pathogenesis and management. *Oncol Lett*. 2017;14(5):5671–80.
48. João CF, Tinucci-Costa M, Cardilli DJ, Faria JLM, Magalhães GM, Alessi AC. Expressão da E-caderina em carcinoma de células escamosas e no tumor de células basais de cães. *Cienc Rural*. 2011;41(9):1611–6.
49. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*. 2016;23(1):27–47.
50. Yousefi M, Bahrami T, Salmaninejad A, Nosrati R, Ghaffari P, Ghaffari SH. Lung cancer-associated brain metastasis: Molecular mechanisms and therapeutic options. *Cell Oncol*. 2017;40(5):419–41.
51. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):239–52.
52. Hegde PS, Karanikas V, Evers S. The where, the when, and the how of immune monitoring for cancer immunotherapies in the era of checkpoint inhibition. *Clin Cancer Res*. 2016;22(8):1865–74.
53. Sui H, Ma N, Wang Y, Li H, Liu X, Su Y, et al. Anti-PD-1/PD-L1 therapy for non-small-cell lung cancer: Toward personalized medicine and combination strategies. *J Immunol Res*. 2018; 2018 Aug 8;2018:6984948.
54. Davoodzadeh Gholami M, kardar GA, Saeedi Y, Heydari S, Garssen J, Falak R. Exhaustion of T lymphocytes in the tumor microenvironment: Significance and effective mechanisms. *Cell Immunol*. 2017;322:1–14.

55. Guevara-Patiño JA, Engelhorn ME, Turk MJ, Liu C, Duan F, Rizzuto G, et al. Optimization of a self antigen for presentation of multiple epitopes in cancer immunity. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1382–90.
56. Farhood B, Najafi M, Mortezaee K. CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: a review. *J Cell Physiol.* 2019;234(6):8509–21.
57. Stabile H, Fionda C, Gismondi A, Santoni A. Role of distinct natural killer cell subsets in anticancer response. *Front Immunol.* 2017;8(MAR):1–8.
58. Hanna RN, Cekic C, Sag D, Tacke R, Thomas GD, Nowyhed H, et al. Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science (80-).* 2015;350(6263):985–90.
59. Olingy CE, Dinh HQ, Hedrick CC. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J Leukoc Biol.* 2019;106(2):309–22.
60. Kaser A, Dunzendorfer S, Offner FA, Ludwiczek O, Enrich B, Koch RO, et al. B Lymphocyte-Derived IL-16 Attracts Dendritic Cells and Th Cells. *J Immunol.* 2000;165(5):2474–80.
61. Ruddell A, Harrell MI, Furuya M, Kirschbaum SB, Iritani BM. B lymphocytes promote lymphogenous metastasis of lymphoma and melanoma. *Neoplasia.* 2011;13(8):748–57.
62. Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M, Jong S de, Samali A. TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? *Cancer Treat Rev.* 2009;35(3):280–8.
63. De Miguel D, Lemke J, Anel A, Walczak H, Martinez-Lostao L. Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell Death Differ.* 2016;23(5):733–47.
64. Elaraj DM, Weinreich DM, Varghese S, Puhmann M, Hewitt SM, Carroll NM, et al. The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. *Clin Cancer Res.* 2006;12(4):1088–96.
65. Carmi Y, Rinott G, Dotan S, Elkabets M, Rider P, Voronov E, et al. Microenvironment-Derived IL-1 and IL-17 Interact in the Control of Lung Metastasis. *J Immunol.* 2011;186(6):3462–71.
66. Wu TC, Xu K, Martinek J, Young RR, Banchereau R, George J, et al. IL1 receptor antagonist controls transcriptional signature of inflammation in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 2018;78(18):5243–58.
67. Cheadle EJ, Riyad K, Subar D, Rothwell DG, Ashton G, Batha H, et al. Eotaxin-2 and colorectal cancer: A potential target for immune therapy. *Clin Cancer Res.* 2007;13(19):5719–28.
68. Levina V, Nolen BM, Marrangoni AM, Cheng P, Marks JR, Szczepanski MJ, et al. Role of eotaxin-1 signaling in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(8):2647–56.

69. Zhu F, Liu P, Li J, Zhang Y. Eotaxin-1 promotes prostate cancer cell invasion via activation of the CCR3-ERK pathway and upregulation of MMP-3 expression. *Oncol Rep.* 2014;31(5):2049–54.
70. Opdenakker G, Froyen G, Fiten P, Proost P, Van Damme J. Human monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3): Molecular cloning of the cDNA and comparison with other chemokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Mar 15;191(2):535-42.
71. Hu JY, Li GC, Wang WM, Zhu JG, Li YF, Zhou GH, et al. Transfection of colorectal cancer cells with chemokine MCP-3 (monocyte chemotactic protein-3) gene retards tumor growth and inhibits tumor metastasis. *World J Gastroenterol.* 2002;8(6):1067–72.
72. Hai Y, Chen N, Wu W, Wang Z, Lin F, Guo C, et al. High postoperative monocyte indicates inferior Clinicopathological characteristics and worse prognosis in lung adenocarcinoma or squamous cell carcinoma after lobectomy. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1–13.
73. An N, Jing W, Wang H, Li J, Liu Y, Yu J, et al. Risk factors for brain metastases in patients with non–small-cell lung cancer. *Cancer Med.* 2018;7(12):6357–64.
74. Kovacs E. The serum levels of IL-12 and IL-16 in cancer patients. Relation to the tumour stage and previous therapy. *Biomed Pharmacother.* 2001;55(2):111–6.
75. Kashfi SMH, Behboudi Farahbakhsh F, Nazemalhosseini Mojarad E, Mashayekhi K, Azimzadeh P, Romani S, et al. Interleukin-16 polymorphisms as new promising biomarkers for risk of gastric cancer. *Tumor Biol.* 2016;37(2):2119–26.
76. Chang WS, Wang SC, Chuang CL, Ji HX, Hsiao CL, Hsu CM, et al. Contribution of interleukin-4 genotypes to lung cancer risk in Taiwan. *Anticancer Res.* 2015;35(11):6297–301.
77. Mattson K, Niiranen A, Pyrhönen S, Holsti LR, Holsti P, Kumpulainen E, et al. Natural interferon alfa as maintenance therapy for small cell lung cancer. *Eur J Cancer.* 1992;28(8–9):1387–91.
78. Belardelli F, Ferrantini M, Proietti E, Kirkwood JM. Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13(2):119–34.
79. Medrano RFV, Hunger A, Mendonça SA, Barbuto JAM, Strauss BE. Immunomodulatory and antitumor effects of type I interferons and their application in cancer therapy. *Oncotarget.* 2017 Jul 25;8(41):71249-84.

80. Mirandola P, Ponti C, Gobbi G, Sponzilli I, Vaccarezza M, Cocco L, et al. Activated human NK and CD8⁺ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood*. 2004;104(8):2418–24.
81. Janssen EM, Droin NM, Lemmens EE, Pinkoski MJ, Bensinger SJ, Ehst BD, et al. CD4⁺ T-cell help controls CD8⁺ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature*. 2005;434(7029):88–93.
82. Yang HY, Kim J, Kim SH, Choe CH, Jang YS. Pro-IL-16 is associated with MHC class II-mediated negative regulation of mouse resting B cell activation through MAP kinases, NF- κ B and Skp2-dependent p27kip regulation. *Scand J Immunol*. 2013;77(3):177–86.
83. Jia T, Serbina N V, Brandl K, Zhong MX, Leiner IM, Charo IF, et al. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*. 2008 May 15;180(10):6846-53.

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



A.C. Camargo Cancer Center
Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP

São Paulo, 06 de fevereiro de 2018.

Ao
Dr. Kenneth John Gollob

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

“Determinação de citocinas solúveis no plasma de pacientes com NSCLC e melanoma maligno tratados com anti-PD1: Associação de perfis solúveis de citocinas com resposta à terapia e progressão da doença.”

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **06/02/2018**, **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 intitulado "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 *Stephanie Martinez lasbeke Ferreira*, sob orientação do Dr. Kenneth John Gollob;
- Dissertação de Mestrado.

Atenciosamente,


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

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, fluidos 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, fluido 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 de 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 A.C.Camargo Cancer Center vai tomar as medidas adequadas para proteger a segurança de todas as amostras.

A A.C.Camargo Cancer Center 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 A.C. Camargo Cancer Center 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.