

**CORRELAÇÃO ENTRE OS DESFECHOS DO TRATAMENTO  
COM O NIVOLUMABE E A RESPOSTA IMUNE E  
INFLAMATÓRIA EM PACIENTES PORTADORES DE  
MELANOMA E CÂNCER DE PULMÃO**

**AUGUSTO OBUTI SAITO**

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente  
para obtenção do título de Mestre em Ciências  
Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima  
Coorientadora: Dra. Amanda Braga de Figueiredo**

**São Paulo  
2021**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente\*

S158a Saito, Augusto Obuti

**Correlação entre os desfechos do tratamento com nivolumabe e a resposta imune e infamatória em pacientes portadores de melanoma e câncer de pulmão /**  
Augusto Obuti Saito - São Paulo, 2021.

94p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima

Descritores. 1. Melanoma/terapiaMelanoma/therapy. 2. Carcinoma Pulmonar d  
Células não Pequenas/terpia/Carcinoma, Non-Small-Cell Lung/therapy. 3. Nivolumabe/uso  
terapêutico/Nivolumab/therapeutic use. 4. Biomarcadores/Biomarkers

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.

## **SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO**

Este estudo (CA 209-950) recebeu apoio da Bristol-Meyers-Squibb (BMS) mediante um acordo firmado com a instituição, dentro de um programa IIS (*Investigator Initiated Study*), sendo avaliado e aprovado pelo PAE e pelo centro de avaliação de viabilidade financeira.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu avô Tetuo Obuti (*in memoriam*), que lutou bravamente contra o câncer de pulmão, recebeu a imunoterapia durante o tratamento e faleceu em novembro de 2020. O “ditian” foi um homem de um coração imenso que prezava pelo amor, honestidade e respeito. O senhor sempre será a minha inspiração.

Obrigado por tudo, Di.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar saúde, sabedoria e perseverança. Nos meus momentos de incertezas e vulnerabilidade, o Senhor sempre esteve do meu lado.

Aos meus pais, José Hissao Saito e Hilda Luriko Obuti, pelo amor incondicional e ensinamentos. Sou eternamente grato.

Ao meu irmão Henrique Obuti Saito, pelo apoio e companheirismo.

Aos meus avós, Tetuo Obuti (in memoriam), Kinuyo Obuti, Kinzi Saito (in memoriam) e Massako Saito (in memoriam) por toda a sabedoria e ensinamentos.

Ao meu orientador Dr. Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima, pela paciência, apoio e ensinamentos. A sua genialidade, honestidade e generosidade são qualidades que me inspiram. O meu sincero agradecimento por me conceder a honra da sua orientação.

À co-orientadora Dra. Amanda Braga de Figueiredo, pelo incentivo e suporte. O seu otimismo e bom humor tornaram a realização dos experimentos no laboratório menos árduos.

À Dra Gabriela Sarti Kinker, pela competência e brilhantismo. A sua colaboração nas análises dos resultados foram fundamentais neste estudo.

Ao estimado amigo Dr. Daniel Vilarim de Araújo, pela colaboração na fase inicial do projeto.

Ao grupo de Genômica e Biologia Molecular liderado pela Dra Dirce Maria Carraro, em especial à Carolina Maria Berra e à Ana Paula Mitsue, pelo empenho e colaboração.

À equipe de patologia, em particular o Dr Clóvis Antônio Lopes Pinto e Laís Takata Walter, pela colaboração.

À estatística Janaína Naiara Germano, pela paciência e cooperação.

Aos residentes da Oncologia Clínica Celso Silva e Sousa Filho e Daniella Dias Silva Sá, pelo apoio e dedicação.

Ao Laboratório de Microscopia Confocal e Citometria de Fluxo da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, em especial à Elizabeth Naomi, por conceder a utilização do microscópio para a captura das imagens das lâminas de imunofluorescência.

Ao A.C.Camargo Cancer Center, minha segunda casa desde 2012, por proporcionar o cuidado humanizado e de excelência aos pacientes oncológicos, promover um ambiente de trabalho saudável e estimular a realização de pesquisas relevantes sobre o câncer com impacto no cenário mundial.

Aos meus colegas do departamento de Oncologia Clínica do A.C.Camargo Cancer Center, pelo acolhimento, respeito e parceria.

Aos meus amigos, pelo apoio, incentivo e amizade.

Finalmente, à toda a minha família por todo o carinho e torcida.

## RESUMO

Saito AO. **Correlação entre os desfechos do tratamento com nivolumabe e a resposta imune e inflamatória em pacientes portadores de melanoma e câncer de pulmão.** [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2021.

**Introdução:** A imunoterapia mudou radicalmente o panorama do tratamento do câncer nos últimos 10 anos. O bloqueio dos *checkpoints* imunológicos CTLA-4 e PD-1/PD-L1, proporcionou respostas duradouras em vários tipos de tumores, incluindo o câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) e o melanoma. Infelizmente, uma grande parcela de pacientes não se beneficia da terapia com os inibidores de *checkpoint* imunológico (ICI) e, apesar do bom perfil de toxicidade, os eventos adversos podem ser graves. Portanto, biomarcadores para identificar os pacientes com maior probabilidade de se beneficiar da imunoterapia são urgentemente necessários. **Objetivo:** Identificar um perfil de expressão gênica e um padrão de infiltrado celular imune associado à resposta tumoral e desfechos clínicos em uma coorte de pacientes com CPCNP e melanoma metastáticos tratados com nivolumabe. **Casística e Métodos:** Foram incluídos os pacientes com CPCNP (20) e melanoma (28) metastáticos tratados com nivolumabe em segunda linha ou posterior no A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brasil, de 2014 a 2016, dentro dos respectivos Programas de Acesso Expandido (EAP). Posteriormente, foram incluídas amostras adicionais de pacientes com CPCNP (10) e melanoma (6) tratados com nivolumabe na mesma instituição, porém fora do EAP. As amostras de tecidos parafinados obtidas antes do início do ICI foram selecionadas e tiveram o RNA extraído. A expressão de 41 genes envolvidos com resposta imune (*CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL19, CCL21, CD247, CD274, CD3D, CD8A, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCR6, DDX58, EOMES, FOXP3, GATA3, GZMA, GZMB, HLA-DRA1, HLA-E-DRA1, IDO1, IFNG, IL10, IRF1, IRF3, IRF7, LAG3, MAVS, NKG7, PDCD1, PFRI, PTPRC, STAT1, TBX21, TGFB, TIGIT, TMEM17, TNFA*) foi analisada por RT-qPCR na plataforma Taq-Man Low-Density Array (TLDA). A composição do infiltrado inflamatório está sendo avaliada por imunofluorescência usando a tecnologia Zenon (Thermo Fisher). Os dados demográficos e os resultados do tratamento foram coletados retrospectivamente dos prontuários médicos. A resposta ao tratamento foi avaliada por RECIST 1.1 e os pacientes foram ainda categorizados, segundo a resposta ao tratamento, em: respondedores (R) [resposta

completa (RC), resposta parcial (RP) e doença estável (DE) maior que 6 meses] ou não respondedores (NR) [DE < 6 meses e progressão da doença (PD)]. A resposta ao tratamento foi correlacionada com a expressão gênica de cada gene isolado usando o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney e regressão logística, e para todo o conjunto de genes, meio de uma clusterização hierárquica não supervisionada. A análise do infiltrado inflamatório está em andamento.

**Resultados:** Na coorte de CPCNP, a idade mediana do início do nivolumabe foi de 58,5 anos. Quinze pacientes (50%) eram do sexo masculino, 80% tinham boa *performance* clínica (ECOG 0-1), 63,3% apresentavam doença metastática ao diagnóstico e 76,6% era fumante ou ex-fumante. O adenocarcinoma foi a histologia mais comum (80%), e apenas 4 pacientes tiveram uma mutação *driver* detectada. O nivolumabe foi administrado como segunda ou terceira linha de tratamento em 73% dos casos. Após um acompanhamento mediano de 43 meses, a SLP mediana foi de 3 meses (IC 95%, 1,14-4,85) e a SG mediana foi de 16 meses (IC 95%, 10,9-21,01). Os pacientes respondedores ao nivolumabe corresponderam a 36,6%. De todos os genes avaliados, os genes *TIGIT*, *STAT1*, *CD8A*, *CXCL9*, *IRF1*, *CCL5*, *PTPRC*, *IL10* e *LAG3* associaram-se com resposta e compõem a assinatura gênica capaz de identificar os indivíduos que responderam. Os pacientes com valor alto da assinatura gênica apresentaram SG e SLP significativamente maiores. Na coorte de melanoma, a idade mediana ao início do nivolumabe foi de 60 anos. Houve um discreto predomínio do sexo masculino (58%), 70% dos pacientes eram brancos, 73,5% foi diagnosticado com doença em estágio inicial ou localmente avançado e 97% possuía ECOG 0-1. O nivolumabe foi administrado na segunda ou terceira linha em 64% dos casos. O tempo de seguimento mediano foi de 50 meses, a SLP mediana com o nivolumabe foi de 5,0 meses (IC 95%, 2,93 – 7,06) e a SG mediana de 21 meses (IC 95%, 12,67 – 29,32). Aproximadamente 44% dos pacientes com melanoma responderam ao anti-PD-1. No grupo de melanoma, a expressão de *CCL19*, *CCL21*, *CCL5*, *CD274*, *CD3D* e *NKG7* correlacionou-se com a resposta ao nivolumabe e tais genes foram analisados em conjunto em uma assinatura genética. Os pacientes com alto valor da assinatura gênica apresentaram SG.

**Conclusão:** Utilizando os genes que selecionamos, fomos capazes de identificar assinaturas de expressão gênica em cada coorte associadas à resposta ao nivolumabe, que também se associaram com SG e SLP.

**Descritores:** Melanoma/terapia. Carcinoma Pulmonar de Células não Pequenas/terapia. Nivolumabe/uso terapêutico. Biomarcadores

## ABSTRACT

Saito AO. [Correlation between nivolumab treatment outcomes and immune and inflammatory response in melanoma and lung cancer patients]. [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2021.

**Introduction:** Immunotherapy has dramatically changed the treatment landscape of cancer in the last 10 years. Blockade of the immune checkpoints CTLA-4 and PD-1/PD-L1, provided long durable responses in many tumor types, including non-small cell lung cancer (NSCLC) and melanoma. Unfortunately, a high proportion of patients do not benefit from immune checkpoint inhibitors (ICI) and, despite an overall acceptable toxicity profile, adverse events can be severe. Therefore, biomarkers to identify patients most likely to benefit from immunotherapy are urgently needed. **Objectives:** To identify a gene expression profile and a pattern of immunwe cell infiltration associated with tumor response and clinical outcomes in a cohort of patients with metastatic NSCLC and melanoma treated with nivolumab. **Methods:** Patients with metastatic NSCLC (20) and melanoma (28) treated with nivolumab in second or further line at the A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil, from 2014 to 2016, were included within the respective Expanded Access Programs (EAP). Subsequently, additional samples were selected from patients with NSCLC (10) and melanoma (6) treated with nivolumab at the same institution, but outside the EAP. RNA was extracted from FFPE samples obtained prior to ICI. The expression of 41 genes involved with immune response (*CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL19, CCL21, CD247, CD274, CD3D, CD8A, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCR6, DDX58, EOMES, FOXP3, GATA3, GZMA, GZMB, HLA-DRA1, HLAE-DRA1, IDO1, IFNG, IL10, IRF1, IRF3, IRF7, LAG3, MAVS, NKG7, PDCD1, PFRI, PTPRC, STAT1, TBX21, TGFB, TIGIT, TMEM17, TNFA*) was analyzed by RT-qPCR in a Taq-Man Low-Density Array platform (TLDA). The composition of the inflammatory infiltrate is being assessed by immunofluorescence using Zenon immunolabeling technology (Thermo Fisher). Demographic data and treatment outcomes were collected retrospectively from medical records. Treatment response was assessed by RECIST 1.1 and patients were further categorized in responder (R) [complete response (CR), partial response (PR) and stable disease (SD) greater than 6 months.] or non-responder [SD less than 6 months and disease progression (DP)]. The association between response to treatment and gene expression was investigated with a

Wilcoxon-Mann-Whitney test, for each isolated gene, and through unsupervised hierarchical clusterization, for the whole gene set. The analysis of the inflammatory infiltrate is still ongoing.

**Results:** In the NSCLC cohort, the median age at nivolumab initiation was 58.5 years. Fifteen patients (50%) were male, 80% had good performance status (ECOG 0-1), 63.3% had metastatic disease at diagnosis and 76.6% were smokers or former smokers. Adenocarcinoma was the most common histology (80%), and only 4 patients had a driver mutation detected. Nivolumab was administered as second or third line of treatment in 73% of cases. After a median follow-up of 43 months, the median PFS was 3 months (95% CI, 1.14-4.85) and the median OS was 16 months (95% CI, 10.9-21.01). Patients responding to nivolumab corresponded to 36.6%. Of all the genes evaluated, *TIGIT*, *STAT1*, *CD8A*, *CXCL9*, *IRF1*, *CCL5*, *PTPRC*, *IL10* and *LAG3* genes were associated with response to nivolumab and were included in a genetic signature that identified those patients who benefited from treatment. Patients with high gene signature value had significantly longer OS and PFS. In the melanoma cohort, the median age at onset of nivolumab was 60 years. There was a slight predominance of males (58%), 70% of the patients were white, 73.5% were diagnosed with early or locally advanced disease and 97% had ECOG 0-1. Nivolumab was administered in the second or third line in 64% of cases. The median follow-up time was 50 months, the median PFS with nivolumab was 5.0 months (95% CI, 2.93 - 7.06) and the median OS was 21 months (95% CI, 12.67 - 29.32). Approximately 44% of melanoma patients responded to anti-PD-1. In the melanoma group, the expression of *CCL19*, *CCL21*, *CCL5*, *CD274*, *CD3D* and *NKG7* genes correlated with response to nivolumab, and these genes were integrated in a genetic signature. Patients with high value of the gene signature had improved OS. **Conclusion:** Using the genes we selected, we were able to identify gene expression signatures associated with response to nivolumab both for NSCLC and melanoma, which were also associated with PFS and OS.

**Keywords:** Melanoma/therapy. Carcinoma, Non-Small-Cell Lung/therapy. Nivolumab/therapeutic use. Biomarkers

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Os três Es da imunoeedição no câncer .....	4
<b>Figura 2</b>	Bloqueio de checkpoint imunológico .....	6
<b>Figura 3</b>	<i>TaqMan Array Card</i> .....	31
<b>Figura 4</b>	Lista e agrupamento dos anticorpos selecionados para cada corte de tecido parafinado na coorte de CPCNP .....	35
<b>Figura 5</b>	Lista e agrupamento dos anticorpos selecionados para cada corte de tecido parafinado na coorte de melanoma .....	35
<b>Figura 6</b>	Fluxograma de inclusão e exclusão das amostras em CPCNP .....	39
<b>Figura 7</b>	Sobrevida livre de progressão na coorte de câncer de pulmão (N=30) tratada com nivolumabe .....	42
<b>Figura 8</b>	Sobrevida global na coorte de câncer de pulmão (N=30) .....	43
<b>Figura 9</b>	Sobrevida livre de progressão nos respondedores e não respondedores ao nivolumabe na coorte de câncer de pulmão (N=30) .....	44
<b>Figura 10</b>	Sobrevida global nos respondedores e não respondedores ao nivolumabe na coorte de câncer de pulmão (N=30) .....	45
<b>Figura 11</b>	Curvas ROC demonstrando o poder de predição de resposta da expressão de genes selecionados ( $p < 0,1$ no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) na coorte de CPCNP (N=30) .....	46

<b>Figura 12</b>	<i>Boxplots</i> comparando a expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$ no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) em respondedores e não-respondedores ao nivolumabe na coorte de CPCNP .....	47
<b>Figura 13</b>	<i>Heatmap</i> mostrando a expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$ no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) na coorte de CPCNP (N=30) .....	48
<b>Figura 14</b>	Curvas de Kaplan-Meier comparando a SLP em pacientes com alta vs. baixa expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$ no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) na coorte de CPCNP (N=30).....	49
<b>Figura 15</b>	Curvas de Kaplan-Meier comparando a SG em pacientes com alta vs. baixa expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$ no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) na coorte de CPCNP (N=30).....	50
<b>Figura 16</b>	(1) <i>Boxplots</i> comparando o valor da assinatura gênica em respondedores e não-respondedores ao nivolumabe em CPCNP (N=30). (2) Curva ROC demonstrando o poder de predição de resposta da assinatura gênica.....	51
<b>Figura 17</b>	Curvas de Kaplan-Meier comparando a SLP (1) e SG (2) em pacientes da coorte de CPCNP (N=30) com alto vs. baixo valor da assinatura gênica .....	51
<b>Figura 18</b>	Curvas ROC demonstrando o poder de predição de resposta da expressão de genes selecionados na coorte de CPCNP (N=21) do banco de dados do GEO GSE136961.....	53
<b>Figura 19</b>	<i>Boxplots</i> comparando a expressão dos genes selecionados em respondedores e não-respondedores ao nivolumabe na coorte de CPCNP (N=21) do banco de dados do GEO GSE136961 .....	54
<b>Figura 20</b>	<i>Heatmap</i> mostrando a expressão dos genes validados em uma coorte de CPCNP (N=21) do banco de dados do GEO GSE136961 .....	55

<b>Figura 21</b>	Curvas de Kaplan-Meier comparando a SLP em pacientes com alta vs. baixa expressão dos genes validados na coorte de CPCNP (N=21) do banco de dados do GEO GSE136961 .....	56
<b>Figura 22</b>	Curvas de Kaplan-Meier comparando a SG em pacientes com alta vs. baixa expressão dos genes validados na coorte de CPCNP (N=21) do banco de dados do GEO GSE136961 .....	57
<b>Figura 23</b>	(1) <i>Boxplots</i> comparando o valor da assinatura gênica em respondedores e não-respondedores ao nivolumabe na coorte de CPCNP (N=21) do banco de dados do GEO GSE136961. (2) Curva ROC demonstrando o poder de predição de resposta da assinatura gênica validada no banco de dados do GEO GSE136961 .....	58
<b>Figura 24</b>	Curvas de Kaplan-Meier comparando a SLP (1) e a SG (2) em pacientes com alto vs. baixo valor da assinatura gênica na coorte de CPCNP (N=21) do banco de dados do GEO GSE136961.....	58
<b>Figura 25</b>	Fluxograma de inclusão e exclusão das amostras em melanoma.....	59
<b>Figura 26</b>	Sobrevida livre de progressão na coorte de melanoma (N=34).....	61
<b>Figura 27</b>	Sobrevida global na coorte de melanoma (N=34).....	62
<b>Figura 28</b>	Sobrevida livre de progressão nos respondedores e não respondedores ao nivolumabe na coorte de melanoma (N=34) .....	63
<b>Figura 29</b>	Sobrevida global nos respondedores e não respondedores ao nivolumabe na coorte de melanoma (N=34).....	64
<b>Figura 30</b>	Curvas ROC demonstrando o poder de predição de resposta da expressão de genes selecionados ( $p < 0,1$ no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) na coorte de melanoma (N=34) .....	65

<b>Figura 31</b>	<i>Boxplots</i> comparando a expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$ no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) em respondedores e não-respondedores ao nivolumabe na coorte de melanoma (N=34) .....	65
<b>Figura 32</b>	<i>Heatmap</i> mostrando a expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$ no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) na coorte de melanoma (N=34) .....	66
<b>Figura 33</b>	Curvas de Kaplan-Meier comparando a SLP em pacientes com alta vs. baixa expressão dos genes selecionados na coorte de melanoma .....	67
<b>Figura 34</b>	Curvas de Kaplan-Meier comparando a SG em pacientes com alta vs. baixa expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$ no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) na coorte de melanoma (N=34).....	68
<b>Figura 35</b>	(1) <i>Boxplot</i> comparando o valor da assinatura gênica em respondedores e não-respondedores ao nivolumabe em melanoma (N=34).....	69
<b>Figura 36</b>	Curvas de Kaplan-Meier comparando SLP (1) e SG (2) em pacientes da coorte de melanoma (N=34) com alto vs. baixo valor da assinatura gênica ...	69
<b>Figura 37</b>	<i>Boxplots</i> comparando a expressão dos genes selecionados em respondedores e não-respondedores ao nivolumabe na coorte de melanoma (N=25) do banco de dados do GEO GSE93157 .....	70
<b>Figura 38</b>	(1) <i>Boxplots</i> comparando o valor da assinatura gênica em respondedores e não-respondedores ao nivolumabe na coorte de melanoma (N=25) do banco de dados do GEO GSE93157l. (2) Curva ROC demonstrando o poder de predição de resposta da assinatura gênica validada no banco de dados do GEO GSE93157 .....	71
<b>Figura 39</b>	Imunofluorescência multiplex através da tecnologia Zenon em uma amostra tecidual da coorte de CPCNP .....	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Imunofluorescência multiplex através da tecnologia Zenon em uma amostra tecidual da coorte de CPCNP .....	10
<b>Tabela 2</b>	Relação dos genes selecionados para a análise do perfil de expressão gênica nas coortes de câncer de pulmão e melanoma, distribuídos conforme a função desempenhada pelas respectivas proteínas .....	32
<b>Tabela 3</b>	Características demográficas e clínico-patológicas dos pacientes na coorte de câncer de pulmão (N=30) .....	41
<b>Tabela 4</b>	Desfechos de sobrevida e resposta tumoral com o nivolumabe em pacientes com câncer de pulmão (N=30) .....	43
<b>Tabela 5</b>	Análise multivariada da coorte de CPCNP (N=30) comparando a SG de pacientes com alto vs baixo valor da assinatura gênica por regressão de Cox ajustada para tabagismo, ECOG pré-nivolumabe e número de metástases pré-nivolumabe .....	52
<b>Tabela 6</b>	Características demográficas e clínico-patológicas dos pacientes na coorte de melanoma (N=34).....	60
<b>Tabela 7</b>	Desfechos de sobrevida e resposta tumoral com o nivolumabe em pacientes com melanoma (N=34).....	62
<b>Tabela 8</b>	Análise multivariada da coorte de melanoma (N=34) comparando a SG de pacientes com alto vs baixo valor da assinatura gênica por regressão de Cox ajustada para o status de mutação em <i>BRAF</i> e número de metástases pré-nivolumabe .....	70

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

<b>ACTB</b>	Do inglês: <i>Actin beta</i>
<b>AF</b>	Alexa Fluor
<b>ALK</b>	Do inglês: <i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>APC</b>	Célula apresentadora de antígenos
<b>AUC</b>	Área sob a curva
<b>BCG</b>	Bacillus Calmette-Guérin
<b>BCR</b>	Do inglês: <i>Breakpoint cluster region</i>
<b>BMS</b>	Bristol-Meyers-Squibb
<b>BRAF</b>	Do inglês: <i>B raf proto-oncogene</i>
<b>BSA</b>	Do inglês: <i>Bovine serum albumin</i>
<b>B2M</b>	Beta 2 microglobulina
<b>CBLB</b>	Do inglês: <i>Cbl Proto-Oncogene B</i>
<b>CCR</b>	Carcinoma colorretal
<b>CCL</b>	Do inglês: <i>C-C motif chemokine ligand</i>
<b>CD</b>	Do inglês: <i>Cluster of differentiation</i>
<b>CEC</b>	Carcinoma espinocelular
<b>CEP</b>	Comitê de ética e pesquisa
<b>CIPE</b>	Centro Internacional de Pesquisa e Ensino
<b>CONEP</b>	Conselho Nacional de Ensino e Pesquisa
<b>COVID-19</b>	Do inglês: <i>Coronavirus disease 2019</i>
<b>CPCNP</b>	Carcinoma de pulmão de células não pequenas
<b>CPPC</b>	Carcinoma de pulmão de pequenas células
<b>CTC</b>	Célula tumoral circulante
<b>CTLA4</b>	Antígeno 4 do linfócito T citotóxico
<b>CXCL</b>	Do inglês: <i>C-X-C motif chemokine ligand</i>
<b>CXCR</b>	Do inglês: <i>C-X-C motif chemokine receptor</i>
<b>DAPI</b>	Do inglês: <i>6-diamidino-2-phenylindole</i>
<b>DCs</b>	Células dendríticas
<b>DE</b>	Doença estável

<b>ctDNA</b>	DNA circulante tumoral
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico, do inglês: <i>desoxyribonucleic acid</i>
<b>EAIM</b>	Eventos adversos imunomediado
<b>EAP</b>	Programa de acesso expandido
<b>ECOG</b>	Do inglês: <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
<b>EGFR</b>	Receptor do fator de crescimento epidérmico
<b>EOMES</b>	Do inglês: <i>Eomesodermin</i>
<b>FDA</b>	Do inglês: <i>Food and Drug Administration</i>
<b>FFPE</b>	Fixado em formalina e embebido em parafina
<b>FOXP3</b>	Do inglês: <i>Forkhead box P3</i>
<b>FYB1</b>	Do inglês: <i>FYN Binding Protein 1</i>
<b>GAPDH</b>	Do inglês: <i>Glyceraldehyde – 3- phosphate dehydrogenase</i>
<b>GATA3</b>	Do inglês: <i>Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA 3</i>
<b>GEP</b>	Perfil de expressão gênica
<b>Gp 100</b>	Glicoproteína 100
<b>GZMA</b>	Do inglês: <i>Granzyme A</i>
<b>GZMB</b>	Do inglês: <i>Granzyme B</i>
<b>GUSB</b>	Do inglês: <i>Glucuronidase beta</i>
<b>HLA</b>	Do inglês: <i>Human Leukocyte Antigen</i>
<b>HPRT1</b>	Do inglês: <i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
<b>HR</b>	Do inglês: <i>Hazard Ratio</i>
<b>ICIs</b>	Inibidores de <i>checkpoint</i> imunes
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Do inglês: <i>Interferon-gamma</i>
<b>IFNG</b>	Do inglês: <i>Interferon-gamma</i>
<b>IHQ</b>	Imuno-histoquímica
<b>IIS</b>	Do inglês: <i>Investigator initiated study</i>
<b>IKZF4</b>	Do inglês: <i>IKAROS Family Zinc Finger 4</i>
<b>IL10</b>	Interleucina 10
<b>Ifm</b>	Imunofluorescência multiplex
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IRF1</b>	Do inglês: <i>Interferon regulatory factor 1</i>
<b>IRF3</b>	Do inglês: <i>Interferon regulatory factor 3</i>
<b>IRF7</b>	Do inglês: <i>Interferon regulatory factor 7</i>

<b>JAK</b>	Do inglês: <i>Janus kinase</i>
<b>KRAS</b>	Do inglês: <i>Kirsten rat viral sarcoma oncogene homolog</i>
<b>LAG3</b>	Do inglês: <i>Lymphocyte-activation 3</i>
<b>LHc</b>	Linfoma de Hodgkin clássico
<b>LKB1</b>	Do inglês: <i>Liver kinase B1</i>
<b>MAVS</b>	Do inglês: <i>Mitochondrial antiviral-signaling</i>
<b>Mb</b>	Megabase
<b>MLH1</b>	Do inglês: <i>MutL homolog 1</i>
<b>MSH2</b>	Do inglês: <i>MutL homolog 2</i>
<b>MSH6</b>	Do inglês: <i>MutS Homolog 6</i>
<b>dMMR</b>	<i>Mismatch repair</i> deficiente
<b>pMMR</b>	<i>Mismatch repair</i> proficiente
<b>MSI</b>	Instabilidade de microssatélites
<b>MHC</b>	Complexo de histocompatibilidade maior
<b>NGS</b>	Sequenciamento de nova geração
<b>NK</b>	Do inglês: <i>Natural killer</i>
<b>NKG7</b>	Do inglês: <i>Natural killer cell granule 7</i>
<b>NLR</b>	Taxa Neutrófilo-Linfócito
<b>NR</b>	Não respondedor
<b>OS</b>	Do inglês: <i>Overall survival</i>
<b>PBS</b>	Do inglês: <i>Phosphate-saline buffer</i>
<b>PD</b>	Progressão de doença
<b>PD1</b>	Receptor de morte celular programada 1
<b>PDCD1</b>	Do inglês: <i>Programmed cell death 1</i>
<b>PD-L1</b>	Ligante do receptor de morte celular programada 1
<b>PD-L2</b>	Ligante do receptor de morte celular programada 2
<b>PFR1</b>	Do inglês: <i>Paraflagellar rod 1</i>
<b>PFS</b>	Do inglês: <i>Progression free survival</i>
<b>PMS2</b>	Do inglês: <i>Postmeiotic Segregation Increased 2</i>
<b>PSMB9</b>	Do inglês: <i>Proteasome 20S Subunit Beta 9</i>
<b>PTEN</b>	Do inglês: <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
<b>PTPRC</b>	Do inglês: <i>Protein tyrosine phosphatase receptor type C</i>
<b>R</b>	Respondedor

<b>RC</b>	Resposta completa
<b>RECIST</b>	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
<b>RIG1</b>	Do inglês: <i>Retinoic acid inducible gene 1</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico, do inglês: <i>ribonucleic acid</i>
<b>ROC</b>	Característica de operação do receptor
<b>RP</b>	Resposta parcial
<b>RPLP0</b>	Do inglês: <i>Ribosomal protein lateral stalk subunit P0</i>
<b>RT-qPCR</b>	Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa
<b>SG</b>	Sobrevida global
<b>SGm</b>	Sobrevida global mediana
<b>SLP</b>	Sobrevida livre de progressão
<b>SLPm</b>	Sobrevida livre de progressão mediana
<b>STAT1</b>	Do inglês: <i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
<b>STING</b>	Do inglês: <i>Stimulator of interferon response CGAMP interactor 1</i>
<b>STK11</b>	Do inglês: <i>Serine/Threonine Kinase 11</i>
<b>TBET</b>	T-bet
<b>TBX21</b>	Do inglês: <i>T box transcription factor 21</i>
<b>TCR</b>	Receptores das Células T
<b>TGF-β</b>	Fator de crescimento transformador beta
<b>TIL</b>	Infiltrado linfocitário tumoral
<b>TIGIT</b>	Do inglês: <i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
<b>TKI</b>	Inibidor de tirosina quinase
<b>TLDA</b>	Do inglês: <i>Taqman Low Density Array</i>
<b>TMB</b>	Carga mutacional tumoral
<b>TNFA</b>	Do inglês: <i>Tumor necrosis fator alpha</i>
<b>TRO</b>	Taxa de resposta objetiva
<b>TS</b>	Tempo de seguimento
<b>Tregs</b>	Células T reguladoras
<b>TSm</b>	Tempo de seguimento mediano
<b>WES</b>	Do inglês: <i>Whole exome sequencing</i>
<b>WNT</b>	Do inglês: <i>Wingless-related integration site</i>

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
2.1	Câncer de Pulmão .....	2
2.2	Melanoma .....	3
2.3	Imunoterapia no Tratamento do Câncer .....	3
2.4	Biomarcadores .....	13
2.4.1	PD-L1 e PD-L2.....	14
2.4.2	Deficiência das Proteínas de Reparo de Mismatch (dMMR) e Instabilidade de Microsatélite (MSI-H).....	15
2.4.3	Carga Mutacional Tumoral (TMB) .....	16
2.4.4	O Sistema HLA.....	19
2.4.5	Microbioma.....	19
2.4.6	Infiltrado Linfocitário Tumoral (TIL) .....	20
2.4.7	Assinaturas de Expressão Gênica como Biomarcadores .....	21
2.4.8	Mutações de Genes Específicos como Biomarcadores.....	23
2.4.9	Biomarcadores no Sangue Periférico.....	23
2.5	Aspectos Econômicos da Imunoterapia.....	24
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
3.1	Objetivo Geral .....	26
3.2	Objetivos Específicos .....	26
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
4.1	População do Estudo.....	27
4.1.1	Critérios de Inclusão .....	27
4.1.2	Critério de Exclusão .....	28
4.2	Coleta e Tabulação das Amostras e Dados.....	28
4.2.1	Seleção de Amostras de Tecidos Tumorais Fixados em Formaldeído e Emblocados em Parafina (FFPE) .....	28

4.2.2	Extração de DNA e RNA de Tecidos Tumorais Fixados em Formaldeído e Emblocados em Parafina (FFPE).....	29
4.3	Análise de Expressão Gênica e Avaliação do Infiltrado Inflamatório/Imune .....	29
4.3.1	Análise de Expressão por RT-qPCR na Plataforma TLDA.....	29
4.3.2	Validação da Assinatura de Expressão Gênica.....	32
4.3.3	Análise do Infiltrado Inflamatório Tumoral por Imunofluorescência Multiplex (IFm).....	33
4.3.4	Quantificação do Infiltrado Inflamatório/Imune.....	36
4.4	Análise das Características Clínicas .....	36
4.5	Análise Estatística.....	36
4.6	Comitê de Ética e Pesquisa (CEP).....	37
4.7	Fonte Financiadora .....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
5.1	Câncer de Pulmão de Células não Pequenas (CPCNP).....	39
5.1.1	Perfil dos pacientes com CPCNP .....	39
5.1.2	Desfechos Clínicos com o Nivolumabe em CPCNP.....	42
5.1.3	Associação da Expressão Gênica com os Desfechos Clínicos em CPCNP.....	45
5.1.4	Validação dos Genes e Assinaturas Gênicas em CPCNP.....	52
5.2	Melanoma .....	59
5.2.1	Perfil dos Pacientes com Melanoma.....	59
5.2.2	Desfechos Clínicos com o Nivolumabe em Melanoma.....	61
5.2.3	Associação da Expressão Gênica com os Desfechos Clínicos em Melanoma .....	64
5.2.4	Validação dos Genes e Assinaturas Gênicas em Melanoma .....	70
5.3	Análise do Infiltrado Imune Tumoral por Imunofluorescência Multiplex .....	71
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>ETAPAS FUTURAS DO PROJETO.....</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>

## **ANEXO**

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

## **APÊNDICE**

**Apêndice 1** Tabelas Complementares

# 1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública global, responsável por cerca de 9,9 milhões de óbitos no mundo em 2020 <sup>1</sup>. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), 625 mil novos diagnósticos serão realizados para cada ano do triênio 2020-2022 <sup>2</sup>. Estima-se que o câncer será a principal causa de mortalidade na população brasileira nos próximos 20 anos, superando as doenças cardiovasculares <sup>3</sup>.

As neoplasias são decorrentes de alterações genéticas e epigenéticas, que podem acarretar ativação de oncogenes ou a inativação de genes supressores tumorais <sup>4</sup>. Na carcinogênese, os sucessivos eventos mutacionais (somáticos ou germinativos) provocam um descontrole nas vias que regulam a proliferação e morte celular, afetando a homeostase e, conseqüentemente, predispondo a transformação maligna de células outrora normais <sup>4</sup>.

O sistema imunológico exerce um papel crucial na vigilância imune contra as células tumorais, reconhecendo-as e eliminando-as <sup>5</sup>. Entretanto, a habilidade das neoplasias de evadirem da destruição pelo sistema imune é uma das etapas fundamentais da carcinogênese e foi definida por Hanahan e Weinberg <sup>5</sup> como um dos marcos principais na progressão tumoral.

O surgimento de novas modalidades terapêuticas no combate ao câncer, como a imunoterapia, está provocando uma drástica mudança de paradigma no tratamento dos pacientes oncológicos <sup>6</sup>. Os inibidores de *checkpoint* imunes (ICIs) são considerados uma nova geração de imunoterápicos que têm como alvo os receptores inibidores nas células T, revigorando as respostas imunológicas antitumorais <sup>7</sup>. Os ICIs mostraram resultados promissores na terapia de diversos tumores, particularmente em melanoma e câncer de pulmão <sup>7</sup>.

A identificação de biomarcadores é indispensável no intuito de melhor selecionar aqueles indivíduos que se beneficiarão do tratamento, poupar de efeitos colaterais aqueles sabidamente não responsivos e minimizar os custos. Atualmente, a despeito de grandes esforços, infelizmente, não há um biomarcador robusto capaz de prever resposta à imunoterapia.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CÂNCER DE PULMÃO

No mundo, o segundo tipo de câncer mais incidente é o de pulmão, com 2,2 milhões de novos casos diagnosticados por ano<sup>1</sup>. Segundo o *Global Burden of Disease Study*<sup>8</sup>, o câncer de pulmão é a principal causa de mortalidade por câncer, causando cerca de 1,7-1,8 milhões de mortes/ano no mundo, e o que apresenta a maior taxa de mortalidade padronizada dentre todos os tipos de câncer (26,6 mortes por 100.000 habitantes). No Brasil, à exceção de câncer de pele não melanoma, o câncer de pulmão será o segundo mais comum nos homens e o quarto mais prevalente entre as mulheres, com um total de 30 mil novos casos para cada ano do triênio 2020-2022<sup>3</sup>. A taxa de sobrevivência em cinco anos padronizada pela idade no Brasil é de 18%, igualmente às taxas globais, que variam de 10 a 20%<sup>9</sup>.

O tabaco é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão. Estima-se que 80-90% dos casos de câncer de pulmão estejam relacionados com o hábito de fumar<sup>10,11</sup>. Além do tabagismo, outros fatores podem estar associados ao desenvolvimento do câncer de pulmão, como fatores genéticos, hormonais e metabólicos. Nas mulheres, parece haver uma distinção no comportamento e no desenvolvimento do câncer de pulmão quando comparado ao observado entre homens em relação ao efeito do tabagismo e sua interação com os outros fatores acima citados<sup>12,13</sup>.

Histologicamente, os tumores de pulmão são divididos em carcinomas de pulmão de células não pequenas (CPCNP), carcinomas de pulmão de pequenas células (CPPC) e tumores neuroendócrinos de pulmão<sup>14,15</sup>. Os CPCNP são responsáveis aproximadamente por 85-90% de todos os casos de câncer de pulmão e os subtipos histológicos principais são o adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de grandes células, carcinoma adenoescamoso e carcinoma sarcomatoide<sup>16,17,18</sup>. O adenocarcinoma compreende cerca de 40% de todos os casos, podendo apresentar eventualmente um crescimento lento e ocorre mais comumente na periferia dos pulmões<sup>7</sup>. Já o carcinoma de células escamosas (CEC) corresponde a 25-30% de todos os casos de câncer de pulmão e está localizado frequentemente nas porções mais centrais do pulmão<sup>7</sup>.

Cerca de 55% dos casos das neoplasias malignas de pulmão são diagnosticados com evidências de metástases à distância. Desta forma, o tratamento desses pacientes apresenta

intuito paliativo na maioria dos casos, sendo a sobrevida em 5 anos na era pré terapia-alvo e imunoterapia de aproximadamente 5% <sup>19</sup>.

## 2.2 MELANOMA

O melanoma é uma neoplasia de baixa incidência, com estimativas de 4.200 casos novos em homens e 4.250 em mulheres, no Brasil, para o triênio 2020-2022 <sup>3</sup>. Embora o melanoma corresponda a apenas 5% dos casos novos de câncer, ele detém a maior taxa de mortalidade entre todos os tumores de pele, sendo responsável por 65-80% de todos os óbitos <sup>7,20</sup>. A sobrevida dos pacientes em estágios avançados da doença não ultrapassa 50% em 5 anos <sup>21</sup>.

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma são: exposição solar intermitente; condições intrínsecas do próprio indivíduo, como pele e olhos claros; o número de nevos; presença de nevo congênito gigante; imunossupressão; xeroderma pigmentoso e fatores genéticos <sup>22,23</sup>. No Brasil, a maior incidência de melanoma é na região Sul, principalmente na população caucasiana <sup>3,22</sup>.

O melanoma primário pode surgir em qualquer área do corpo onde há melanócitos e a pele é o principal sítio <sup>7</sup>. Histologicamente, o melanoma cutâneo é classificado em: extensivo superficial, nodular, acral lentiginoso e lentigo maligno <sup>7</sup>.

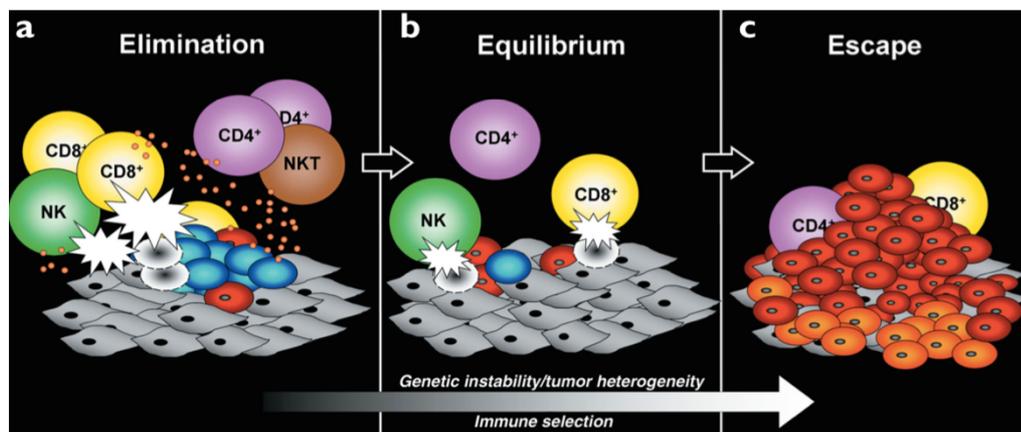
O comprometimento do linfonodo sentinela pelo melanoma aumenta o risco de recidiva e está diretamente relacionado com o prognóstico da doença. A pele é o local mais comum de metástase. Aproximadamente 10% dos pacientes desenvolverão metástases viscerais, sendo o pulmão e a pleura os sítios mais comuns. Outros órgãos frequentemente acometidos no cenário metastático são o cérebro e fígado <sup>24</sup>.

## 2.3 IMUNOTERAPIA NO TRATAMENTO DO CÂNCER

Esforços iniciais para redirecionar o sistema imune para controlar o câncer datam do final do século XIX. Naquela época, alguns relatos de casos associaram determinados tipos de infecções com a remissão de algumas neoplasias consideradas incuráveis. Em meados de 1891, o cirurgião oncológico Dr. William B. Coley, após o falecimento de uma paciente portadora de sarcoma, conduziu um experimento no qual induziu infecções cutâneas através da inoculação da bactéria *S. pyogenes*, com o intuito de ativar a resposta imune contra o

câncer<sup>25</sup>. Entretanto, ele observou que a minoria dos pacientes desenvolveu erisipela e a cura da neoplasia foi algo excepcionalmente difícil. Além disso, dois óbitos foram registrados em decorrência de septicemia. Posteriormente, Dr. Coley realizou outro estudo no qual administrou bactérias inativadas (*S. pyogenes* e *S. marcescens*), desta vez, alcançando resultados oncológicos bastante expressivos <sup>25</sup>. No entanto, devido aos resultados inconsistentes e ao desenvolvimento de terapias mais eficazes, como a quimioterapia e a radioterapia, o racional de estimular o sistema imune para combater o câncer foi, por muito tempo, pouco explorado pela comunidade científica <sup>26</sup>.

Apesar dos obstáculos iniciais, as investigações continuaram para elucidar as interações entre o sistema imune e as células tumorais. No início do século XX, Paul Erlich introduziu o conceito da imunovigilância do câncer, sugerindo que o surgimento de células malignas é reprimido pela sistema imunológico do hospedeiro <sup>26</sup>. Posteriormente, alguns estudos demonstraram que o sistema imunológico é capaz de detectar a neoplasia a partir do reconhecimento de neoantígenos específicos nas células tumorais e eliminá-las <sup>27</sup>. Mais recentemente, Dunn et al. <sup>28</sup> criaram o conceito da imunoedição do câncer em que reconhecem a importância da imunidade tanto na supressão quanto na mediação do crescimento tumoral, atuando em 3 fases sequenciais: eliminação, equilíbrio e escape.



Fonte: Adaptado de Dunn et al. <sup>28</sup>

**Figura 1** - Os três Es da imunoedição do câncer. (a) Eliminação equivale à imunovigilância. O sistema imune reconhece as células com fenótipo maligno e as elimina por completo antes que possam se estabelecer no hospedeiro. Por esse motivo não desenvolvemos câncer numa frequência maior. (b) Na fase de equilíbrio, a atividade antitumoral do sistema imune é contrabalanceada pela instabilidade genética que possibilita o surgimento de variantes portadoras de alterações que permitem resistir aos ataques do sistema imune, de forma que as células tumorais e o sistema imune entram numa fase de equilíbrio dinâmico, entretanto, a pressão constante do sistema imune seleciona ou propicia o crescimento de clones de células tumorais capazes de resistir ao ataque imunológico, que eventualmente leva à fase de escape. (c) Escape é a etapa em que o tumor, moldado imunologicamente, se expande descontroladamente no hospedeiro imunocompetente.

A resposta imune inata engloba barreiras físicas (como as mucosas), fatores solúveis (como o sistema do complemento), células mielóides como as células dendríticas (DCs), macrófagos, monócitos e mastócitos, e células da linhagem linfóide como as células *natural-killer* (NK)<sup>29</sup>. Essas células promovem a defesa inicial do organismo contra patógenos através do processo de fagocitose pelos macrófagos e células polimorfonucleares, e citotoxicidade direta pelas células NK<sup>29</sup>. Além disso, a imunidade inata interage com o sistema imune adaptativo, exercendo um papel primordial para o início da resposta mediada pela célula T, o desenvolvimento de células T de memória e a produção de anticorpos<sup>29</sup>.

A resposta imune adaptativa antitumoral é mediada primordialmente por células T, sendo um fenômeno complexo que abrange múltiplos passos, tais como: seleção clonal de células antígeno-específicas, ativação e proliferação nos tecidos linfóides, migração para os locais onde estão os antígenos para, finalmente, executar suas funções efetoras e auxiliar outras células do sistema imune<sup>30</sup>. Cada etapa desse processo é regulado por sinais estimuladores e inibidores<sup>6</sup>.

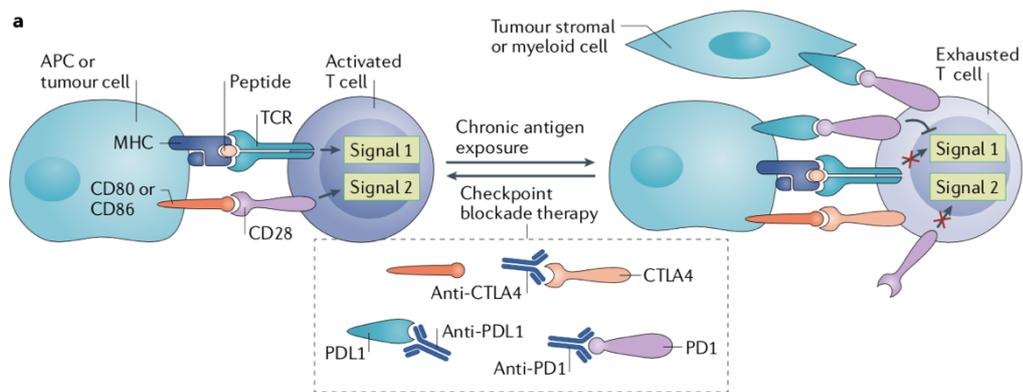
Para as células T, a amplitude e a qualidade da resposta imune dependem das interações entre os receptores das células T (TCR) e o complexo de histocompatibilidade maior (MHC) da célula apresentadora de antígenos (APC), que são reguladas por um equilíbrio entre sinais co-estimuladores e co-inibidores (*checkpoints* imunes)<sup>6,31</sup>. Sob circunstâncias normais, os *checkpoints* imunes são essenciais para a manutenção da auto-tolerância e homeostase, agindo como um “freio” que previne a hiperativação das células T e impedindo danos imunomediados contra os tecidos normais<sup>32</sup>. Entretanto, a expressão dessas proteínas de *checkpoint* imune pode estar desregulada nas neoplasias e atuar como um importante mecanismo de resistência imunológica<sup>6</sup>.

Nos linfonodos, após os antígenos ligados ao MHC das APCs serem apresentados para os TCRs correspondentes (sinal 1), um outro sinal co-estimulador (sinal 2), resultado da interação entre o CD28 e o ligante B7 (CD80 e CD86), é necessário para completar a ativação da célula T (Figura 2)<sup>6,26</sup>. Além disso, um terceiro sinal, representado pela ação de citocinas, será importante para a diferenciação de subpopulações específicas de linfócitos T.

O antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA4) foi um dos primeiros *checkpoints* imunes descrito. O CTLA4 torna-se expresso nas células T após a ativação e concorre com o CD28 pelo mesmo ligante B7, mas com afinidade superior<sup>6</sup>. Desta maneira, o CTLA 4, ao interagir com o ligante B7 nas APCs, impede a ativação da célula T ao bloquear o sinal co-estimulador (Figura 2)<sup>6</sup>. O CTLA4 também exerce um importante papel nos linfócitos T CD4, suprimindo a atividade dos linfócitos T *helper* e estimulando as células T

reguladoras (Tregs), que funcionam como uma outra importante via de supressão da resposta imune<sup>6,26</sup>.

A inibição dos *checkpoints* imunes é uma estratégia atrativa no combate ao câncer e, de fato, vem mudando o paradigma de tratamento de diversas neoplasias. A primeira demonstração da atividade antitumoral em modelo animal com um inibidor de *checkpoint* foi com o anticorpo contra o CTLA4, descrito por Leach et al.<sup>33</sup>. Em meados de 2000, o primeiro estudo clínico com um inibidor de *checkpoint* imune foi conduzido em humanos e, finalmente, em 2010, a agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o ipilimumabe, um anticorpo contra o CTLA4, para o tratamento de melanoma metastático, haja visto que foi a primeira droga que demonstrou benefício em sobrevida nesse cenário<sup>34</sup>.



Fonte: Adaptado de Havel et al. (2009)<sup>35</sup>

**Figura 2 - Bloqueio de *checkpoint* imunológico.** A ativação das células T depende de dois sinais. O primeiro sinal surge a partir da ligação de peptídeos derivados de antígenos-alvo, apresentado pelo complexo de histocompatibilidade maior (MHC) das células apresentadoras de antígenos (APC), ao receptor de células T (TCR). O segundo sinal ocorre pela ligação do receptor co-estimulador CD28 das células T com o seu ligante CD80 (B7-1) ou CD86 (B7-2) na superfície das APCs. Após a ativação, as células T passam a expressar receptores co-inibidores, como o antígeno 4 do linfócito T citotóxico (CTLA4) e o receptor de morte celular programada 1 (PD1). O CTLA4 concorre com o CD28 pela ligação com o CD80 e CD86, porém com uma afinidade significativamente superior. Desta maneira, a interação do CTLA4 com o CD80 ou o CD86 inibe a ativação contínua das células T por impedir a geração dos sinais co-estimuladores secundários (sinal 2). O bloqueio do CTLA4 promove a reativação de células T nos órgãos linfoides secundários. Já o PD1 interage com o ligante do receptor de morte celular programada 1 (PD-L1), bloqueando o sinal 1 ao inibir a sinalização a jusante do TCR. O PD-L1 pode estar expresso nas células tumorais ou do microambiente tumoral. Portanto, as células T exauridas no tumor podem tornar-se revigoradas com os anticorpos direcionados contra o PD1 ou o PD-L1.

Em dois estudos de fase III, o ipilimumabe prolongou significativamente a sobrevida dos pacientes com melanoma avançado<sup>34,36</sup>. Em um desses estudos, os pacientes com melanoma previamente tratados no cenário metastático foram randomizados para receber ipilimumabe mais vacinação com glicoproteína 100 (gp100), ipilimumabe isolado ou gp100 isolada. Nos braços que receberam ipilimumabe, observou-se um aumento significativo da sobrevida global (SG) [ipilimumabe mais gp100 x gp100, sobrevida global mediana

(SGm):10,0 meses x 6,4 meses (HR=0,68;  $p<0,001$ ) e ipilimumabe isolado x gp100, SGm:10,1 meses x 6,4 meses (HR=0,66  $p=0,003$ )]<sup>34</sup>.

O segundo estudo avaliou pacientes portadores de melanoma metastático sem tratamento prévio que foram randomizados para receber ipilimumabe e dacarbazina ou placebo e dacarbazina e, novamente, o uso de anti-CTLA4 resultou em superioridade em sobrevida global com redução do risco relativo de morte de 28% (SGm: 11,2 meses x 9,1 meses; HR=0,72;  $p<0,001$ )<sup>36</sup>. Embora a minoria dos pacientes tenha alcançado resposta completa com o ipilimumabe, tais respostas foram duradouras na maioria dos casos<sup>36</sup>. A taxa de sobrevida em 3 anos dos pacientes com melanoma metastático tratados com o anti-CTLA4 foi de 22%, aproximadamente<sup>37</sup>. A curva de sobrevida atingiu um platô sem precedentes após 10 anos de seguimento<sup>37</sup>.

O receptor de morte celular programada 1 (PD-1) é outro importante *checkpoint* imune e está associado com o controle da atividade da célula T nos tecidos periféricos<sup>38</sup>. O PD 1 age limitando a atividade das células T na periferia durante uma resposta imunológica, através da interação com os seus ligantes PD-L1 e PD-L2, resultando na supressão desta resposta imune (Figura 2)<sup>35</sup>. O PD-1 é expresso principalmente nos linfócitos T e B ativados e células NK, e estudos mais recentes apontam sua expressão em células mieloides, como macrófagos e DCs<sup>38</sup>. Já a expressão do PD-L1 e PD-L2 pode ocorrer nas células tumorais, DCs, mastócitos, macrófagos, linfócitos, células endoteliais, entre outras<sup>31,38</sup>. A regulação positiva de PD-L1 nas células tumorais é resultado da sinalização intracelular associada com o processo de carcinogênese que pode ser independente dos sinais inflamatórios no microambiente tumoral (resistência imune inata) ou através do estímulo inflamatório proveniente da resposta imune antitumoral (resistência imune adaptativa)<sup>39</sup>.

Anticorpos monoclonais contra o PD-1 ou o seu ligante, PD-L1, alcançaram resultados expressivos no tratamento de diversas neoplasias, incluindo o melanoma e o CPCNP. No tratamento do melanoma metastático, o nivolumabe, anticorpo anti-PD-1, promoveu taxa de resposta objetiva (TRO) de 43,7% na primeira linha e de 31,7% nas linhas subsequentes ao ipilimumabe (anti-CTLA4)<sup>40,41</sup>. No estudo de fase III Checkmate 066, o nivolumabe em primeira linha proporcionou um aumento significativo da sobrevida livre de progressão (SLP) (SLPm: 5,1 meses x 2,2 meses; HR=0,43 IC95% 0,34-056;  $p<0,001$ ) e da sobrevida global (SG) (SGm: 37,5 meses x 11,2 meses; HR=0,46; IC95% 0,36-059;  $p<0,001$ ) quando comparado com a dacarbazina<sup>40,42</sup>. O pembrolizumabe (anti-PD-1) também foi avaliado no cenário de melanoma avançado sem tratamento prévio e demonstrou maior eficácia (SG, SLP e TR) e menor toxicidade que o ipilimumabe, tornando-se uma nova opção terapêutica<sup>43,44</sup>.

No CPCNP metastático, o nivolumabe foi aprovado pelo FDA e por outras agências reguladoras internacionais no tratamento de segunda linha, após demonstrar superioridade em SG quando comparado com docetaxel, tanto no tratamento do carcinoma de células escamosas (SGm: 9,2 meses x 6,0 meses; HR=0,59; IC95% 0,44-0,79;  $p<0,0001$ ) quanto no do carcinoma de células não escamosas (SGm: 12,2 meses x 9,4 meses; HR=0,73; IC95% 0,59-0,89;  $p=0,002$ )<sup>45,46</sup>. O atezolizumabe, anticorpo anti-PD-L1, foi aprovado pelo FDA para a primeira linha de tratamento na histologia não-escamosa em combinação com carboplatina, paclitaxel e bevacizumabe ou com carboplatina e nab-paclitaxel<sup>47</sup>. Já o pembrolizumabe foi aprovado inicialmente na primeira linha como monoterapia para os pacientes com expressão de PD-L1 na superfície tumoral maior que 50% e, posteriormente, em combinação com quimioterapia independentemente da expressão do PD-L1<sup>48,49</sup>. Recentemente, o pembrolizumabe recebeu aprovação para a terapia isolada dos tumores que expressam PD-L1>1%. Vale ressaltar que o pembrolizumabe também está autorizado para o tratamento em segunda linha do CPNPC metastático e PD-L1 positivo, após a progressão de doença com quimioterapia baseada em platina, bem como o atezolizumabe e o nivolumabe<sup>45,46,47,50</sup>.

O nivolumabe (anti-PD-1) e o ipilimumabe (anti-CTLA4) são inibidores de *checkpoints* imunes distintos, porém com mecanismos de ação complementares. No melanoma metastático, a terapia combinada com esses dois agentes na primeira linha prolongou a sobrevida dos pacientes, alcançando uma taxa de sobrevida em 5 anos de 52%<sup>51</sup>. Tal estratégia também foi avaliada no CPCNP metastático sem tratamento prévio e com PD-L1>1%. Observou-se um benefício em SG para a combinação dos imunoterápicos sobre a quimioterapia (SGm:17,1 meses x 14,9 meses; HR=0,79;  $p=0,007$ )<sup>52</sup>. Entretanto, no CPCNP, os resultados dessa combinação não foram superiores ao uso de bloqueio PD1/PD-L1 isolado, nos tumores com alta expressão de PD-L1, ou à combinação de quimioterapia associada ao bloqueio de PD1/PD-L1.

Yu et al.<sup>53</sup> avaliaram os dados individuais de 14.395 pacientes com CPCNP incluídos em 31 estudos clínicos randomizados. Nesta metanálise, a imunoterapia isolada ou em combinação com um outro agente (imunoterapia, quimioterapia ou anti-angiogênicos) foram superiores em SLP e SG quando comparadas com quimioterapia na primeira linha de tratamento. Em pacientes previamente tratados, a imunoterapia também superou a quimioterapia. No tratamento inicial de pacientes com CPCNP metastático, o esquema que proporcionou o maior benefício em SG e SLP foi a combinação de pembrolizumabe com quimioterapia baseada em platina<sup>53</sup>.

Os anti-PD-1 (nivolumabe, pembrolizumabe e cemiplimabe) e os anti-PD-L1 (atezolizumabe, durvalumabe e avelumabe) têm sido amplamente estudados e já estão aprovados para o tratamento de diversos tumores e em cenários clínicos distintos. Apesar de ambas as classes de ICIs atuarem no bloqueio do eixo inibidor PD-1/PD-L1, não existe um ensaio randomizado comparando diretamente a eficácia entre elas, embora uma metanálise sugira uma vantagem do anti-PD-1 sobre o anti-PD-L1 nos desfechos de sobrevida, independente do subtipo tumoral<sup>54</sup>. No CPCNP, o tratamento combinado do anti-PD-1 e quimioterapia parece proporcionar um incremento significativo na SG e SLP em relação o anti-PD-L1 mais quimioterapia. No entanto, o desempenho destes ICIs em monoterapia foi semelhante<sup>55</sup>.

Atualmente, seis ICIs estão aprovados no Brasil nas mais variadas indicações terapêuticas (Tabela 1)

**Tabela 1** - Inibidores de *checkpoints* imunológicos (ICI) aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) <sup>56</sup>

<b>Medicação</b>	<b>Indicação</b>	<b>Esquema</b>	<b>Cenário</b>
Nivolumabe	Melanoma avançado	Monoterapia ou em combinação com ipilimumabe	Melanoma avançado (irressecável ou metastático).
	Melanoma localmente avançado	Monoterapia	Tratamento adjuvante de melanoma com envolvimento de linfonodos ou doença metastática completamente ressecada
	CPCNP localmente avançado ou metastático	Monoterapia	Após progressão a quimioterapia à base de platina. Pacientes com mutação de <i>EGFR</i> ou rearranjo de <i>ALK</i> devem ter progredido após o tratamento com anti- <i>EGFR</i> e anti- <i>ALK</i> antes de receber nivolumabe.
	Carcinoma de células renais avançado	Monoterapia	Após progressão a terapia antiangiogênica prévia.
		Combinação com ipilimumabe	Primeira linha de tratamento de pacientes com riscos intermediário ou alto (desfavorável).
	Linfoma de Hodgkin clássico (LHc)	Monoterapia	Recidiva ou refratariedade após transplante autólogo de células-tronco seguido de tratamento com brentuximabe vedotina.
	CEC de cabeça e pescoço recorrente ou metastático	Monoterapia	Progressão da doença durante ou após quimioterapia à base de platina.
	Carcinoma urotelial localmente avançado irressecável ou metastático	Monoterapia	Progressão de doença após terapia prévia à base de platina.
Ipilimumabe	CEC de esôfago avançado irressecável ou metastático	Monoterapia	Progressão de doença após quimioterapia à base de fluoropirimidina e platina independentemente da expressão de PD-L1.
	Carcinoma hepatocelular refratário	Combinação com ipilimumabe	Tratamento prévio com sorafenibe e não elegíveis para receber regorafenibe ou ramucirumabe.
	Mesotelioma pleural maligno irressecável	Combinação com ipilimumabe	Primeira linha
Pembrolizumabe	Melanoma avançado	Monoterapia ou combinação com nivolumabe	Melanoma metastático ou inoperável.
	Carcinoma de células renais avançado ou metastático	Combinação com nivolumabe	Primeira linha de tratamento de pacientes com risco intermediário ou alto.
	Melanoma avançado	Monoterapia	Melanoma metastático ou irressecável.
	Melanoma localmente avançado	Monoterapia	Tratamento adjuvante de melanoma com envolvimento de linfonodos.

Cont/ Tabela 1

Medicação	Indicação	Esquema	Cenário
	CPCNP não escamoso metastático	Combinação com quimioterapia com platina e pemetrexede	Primeira linha de tratamento em pacientes sem a mutação de <i>EGFR</i> ou rearranjo de <i>ALK</i> .
	CPCNP escamoso e metastático	Combinação com carboplatina e paclitaxel ou nab-paclitaxel (ligado à albumina)	Primeira linha de tratamento.
	CPCNP avançado ou metastático	Monoterapia	Primeira linha de tratamento e expressão de PD-L1 $\geq 1\%$ (sem mutação de <i>EGFR</i> ou rearranjo de <i>ALK</i> ); ou em estágio III não candidatos a ressecção cirúrgica ou quimiorradioterapia combinada definitiva.
	CPCNP avançado	Monoterapia	Após quimioterapia à base de platina e PD-L1 $\geq 1\%$ . Pacientes com mutações de <i>EGFR</i> ou <i>ALK</i> devem ter sido tratados previamente para essas alterações.
	Carcinoma urotelial localmente avançado ou metastático	Monoterapia	Tratamento prévio com quimioterapia baseado em platina no cenário metastático ou progressão dentro de 12 meses do tratamento neoadjuvante/adjuvante com quimioterapia à base de platina.
	Carcinoma urotelial localmente avançado ou metastático	Monoterapia	Pacientes não elegíveis à quimioterapia com cisplatina e expressão de PD-L1 $\geq 10\%$ .
	Câncer de bexiga não músculo-invasivo	Monoterapia	Pacientes refratários ao Bacillus Calmette-Guérin (BCG) e não candidatos a cistectomia.
	Adenocarcinoma gástrico ou da junção gastroesofágica localmente avançado ou metastático	Monoterapia	Progressão da doença após duas ou mais linhas de terapias prévias incluindo quimioterapia com fluoropirimidina e platina e PD-L1 $\geq 1\%$ .
	LHc refratário ou recidivado	Monoterapia	Progressão de doença após 3 ou mais linhas de terapias anteriores.
	Carcinoma de células renais avançado ou metastático	Combinação com axitinibe	Primeira linha de tratamento.
	CEC de cabeça e pescoço irressecável ou metastático	Monoterapia	Primeira linha de tratamento e PD-L1 $\geq 1\%$ .
		Combinação com quimioterapia baseada em platina e 5-fluorouracil	Primeira linha de tratamento.
	Câncer esofágico localmente avançado ou metastático	Monoterapia	Progressão de doença após uma ou mais linhas anteriores de terapia sistêmica e PD-L1 $\geq 10\%$ .

Cont/ Tabela 1

Medicação	Indicação	Esquema	Cenário
Atezolizumabe	Carcinoma urotelial de bexiga localmente avançado ou metastático	Monoterapia	Progressão de doença após quimioterapia baseada em platina ou pacientes ineligíveis à cisplatina e PD-L1 $\geq 5\%$ .
	CPCNP localmente avançado ou metastático	Monoterapia	Progressão de doença após quimioterapia baseada em platina. Pacientes com mutação em <i>EGFR</i> ou rearranjo de <i>ALK</i> devem ter sido tratados para essas alterações previamente.
		Monoterapia	Tratamento de primeira linha se PD-L1 $\geq 50\%$ das células tumorais ou $\geq 10\%$ das células imunes do infiltrado tumoral e sem mutação de <i>EGFR</i> ou rearranjo de <i>ALK</i> .
Durvalumabe	Câncer de mama triplo-negativo, localmente avançado, irressecável ou metastático	Combinação com nab-paclitaxel	Primeira linha de tratamento e PD-L1.
	Carcinoma urotelial localmente avançado ou metastático	Monoterapia	Progressão da doença com quimioterapia baseado em platina ou dentro de 12 meses do tratamento neoadjuvante/adjuvante com quimioterapia com platina.
	CPCNP estágio III irressecável	Monoterapia	Após quimiorradioterapia baseado em platina, caso não tenha ocorrido progressão de doença.
Avelumabe	CPPC	Combinação com platina e etoposídeo	Primeira linha de tratamento.
	Carcinoma de células de Merkel metastático	Monoterapia	Primeira linha de tratamento.
	Carcinoma de células renais avançado	Combinação com axitinibe	Primeira linha de tratamento.
Cemiplimabe	Carcinoma urotelial localmente avançado ou metastático	Monoterapia	Tratamento de manutenção após quimioterapia de indução baseado em platina.
	CEC de pele irressecável ou metastático	Monoterapia	Tratamento de pacientes com doença metastática ou com lesão localmente avançada sem indicação de cirurgia ou radioterapia.

A despeito dos resultados expressivos alcançados pelos imunoterápicos em inúmeras neoplasias, muitos pacientes não se beneficiam desta modalidade de tratamento. Além disso, o emprego da imunoterapia não é isento de efeitos adversos, haja visto que 15-20% dos pacientes tratados com o anti-PD-1 ou anti-PD-L1 em regime de monoterapia e até 50% com a terapia combinada com o anti-CTLA4 apresentaram toxicidade imunomediada graus 3 ou 4<sup>51</sup>. Os ICIs atuam nas proteínas de *checkpoints* imunológicos (CTLA4, PD-1 e PD-L1) presentes na superfície celular, bloqueando os sinais inibidores entre as células tumorais ou APCs e os linfócitos T e, desta maneira, revigorando as células imunes exaustas. A ativação do sistema imunológico combate as células neoplásicas, mas também pode afetar as células normais, acarretando os chamados eventos adversos imunomediados (EAim). Os EAim podem ocorrer em qualquer órgão do corpo, mas comprometem principalmente a pele, o trato gastrointestinal, o sistema endócrino e os pulmões. A incidência dos EAim relacionados ao uso dos ICIs é de 83,81%<sup>57</sup>. Os efeitos colaterais mais comuns são: diarreia (32,7%), prurido (31,4%), *rash* cutâneo (27,1%), elevação das enzimas hepáticas (17,5%), colite (14,2%), hipotireoidismo (13,7%), hipofisite (9,68%) e pneumonite (7,38%)<sup>58</sup>. Entre os ICIs, o anti-CTLA4 é o que está associado a maior toxicidade, ocasionando uma incidência de eventos adversos graves (graus 3 a 5) de 27% contra 17% dos anti-PD-1/PD-L1<sup>57</sup>. Além disso, a combinação de imunoterápicos aumenta consideravelmente o risco de os pacientes desenvolverem efeitos colaterais comparada com a monoterapia<sup>58</sup>. Embora os ICIs tenham um bom perfil de segurança e os efeitos adversos severos sejam relativamente raros, o reconhecimento imediato dos EAim é de suma importância a fim de se intervir precocemente e reduzir complicações.

## 2.4 BIOMARCADORES

Apesar dos avanços que a imunoterapia tem promovido no cuidado dos pacientes oncológicos, a maioria dos doentes não responderá a esta modalidade de tratamento. Além disso, embora os anti-PD-1/PD-L1 possuam um bom perfil de toxicidade, os efeitos adversos podem ser graves.

Portanto, a identificação de biomarcadores preditivos de resposta aos ICIs é necessária para selecionar aqueles indivíduos com chances reais de se beneficiarem da terapia.

Biomarcador é uma característica que é objetivamente medida ou avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patológicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica<sup>59</sup>.

Nesse sentido, vários marcadores vêm sendo investigados nos últimos anos.

#### 2.4.1 PD-L1 e PD-L2

O PD-L1, principal ligante do PD-1, é tipicamente expresso em macrófagos, mas também pode estar presente nos tumores de maneira constitutiva ou induzida pela resposta imunológica. O PD-L1 é o biomarcador mais estudado na terapia anti-PD-1/PD-L1. Na era pré-imunoterapia, dados de duas metanálises demonstraram que a expressão de PD-L1 estava associada a um pior prognóstico em várias neoplasias<sup>60,61</sup>.

A expressão de PD-L1 na membrana da célula tumoral está associada a um aumento na taxa de resposta global em pacientes tratados com a terapia anti-PD-1/PD-L1 em diversos estudos<sup>62</sup>. No estudo de fase 1 que avaliou o uso do nivolumabe em pacientes portadores de melanoma, CPCNP, carcinoma de células renais, neoplasia de próstata castração resistente e neoplasia de cólon, a taxa de resposta nos indivíduos com tumores PD-L1 positivo (expressão de PD-L1, avaliada por imuno-histoquímica em >5% das células tumorais) foi superior que naqueles com o PD-L1 negativo<sup>63</sup>. Uma metanálise de 12 estudos prospectivos comparou o emprego de anti-PD-1/PD-L1 versus docetaxel na segunda linha de tratamento de CPNPC e demonstrou um benefício do ICI limitado para a subpopulação de pacientes com a expressão de PD-L1 $\geq$ 1%<sup>32</sup>. Atualmente, a pesquisa do PD-L1 por imuno-histoquímica (IHQ) é empregada como diagnóstico complementar para auxiliar na decisão terapêutica com o anti-PD-1. No CPCNP, por exemplo, o pembrolizumabe está indicado na primeira linha se a expressão do PD-L1 for superior a 50% das células tumorais<sup>35</sup>.

Embora inúmeros estudos tenham demonstrado uma associação entre a expressão de PD-L1 e os desfechos clínicos com os ICIs, outros não reproduziram os mesmos resultados<sup>35</sup>. Recentemente, o estudo KEYNOTE 189 avaliou a combinação de quimioterapia e pembrolizumabe na primeira linha de tratamento de CPCNP metastático e observou-se que tal regime prolongou a sobrevida dos pacientes, inclusive no subgrupo com PD-L1<1%, apesar da magnitude de resposta ter sido proporcional ao nível de expressão de PD-L1<sup>49</sup>. Além disso, no estudo CHECKMATE 067, os pacientes com melanoma, mesmo com o PD-L1<1%, apresentaram resposta objetiva na ordem de 41% com o nivolumabe e de 54,8% com a associação de nivolumabe e ipilimumabe<sup>51</sup>.

Em uma recente metanálise, o tratamento do CPCNP metastático com anti-PD-1/PD-L1 em monoterapia aumentou a SG e SLP em relação à quimioterapia, particularmente nos subgrupos de tumores com a expressão do PD-L1 $\geq$ 1%<sup>64</sup>. O mesmo benefício não foi observado nos pacientes com o PD-L1<1%. Naqueles pacientes com o PD-L1 $\geq$ 50%, os

desfechos de SG, SLP e TRO foram ainda melhores com o ICI, tanto na primeira quanto na segunda linha de tratamento. Já a combinação de quimioterapia e imunoterapia na primeira linha de tratamento foi superior à quimioterapia em todos os subgrupos, inclusive naqueles tumores com a expressão do PD-L1 < 1% <sup>64</sup>.

O papel do PD-L1 isoladamente como um biomarcador para as terapias anti-PD-1/PD-L1 ainda é incerto. Existem algumas questões a serem pontuadas como a necessidade de padronização da plataforma de teste e dos anticorpos utilizados na IHQ, estabelecer o ponto de corte ideal para a positividade do PD-L1, definir quais células serão incluídas na pontuação (células tumorais, imunes ou ambas), averiguar as implicações dos métodos de processamento e armazenamento tecidual no resultado do exame, avaliar o papel da heterogeneidade tumoral na expressão entre as amostras (lesão primária versus metastática) e determinar o impacto das terapias prévias (quimioterapia, radioterapia, outras imunoterapias, inibidores de tirosina-quinase) na expressão do PD-L1 <sup>62</sup>.

O PD-L2, o outro ligante da PD-1, está expresso particularmente nas APCs como monócitos, macrófagos e DCs <sup>39</sup>. O papel do PD-L2 em mediar a imunossupressão no microambiente tumoral e o seu valor como um marcador clínico não está bem estabelecido <sup>39</sup>. O efeito preditivo da expressão do PD-L2 no tumor e nas células imunes antes do tratamento com anti-PD-1/PD-L1 é conflitante na literatura <sup>39</sup>. Uma avaliação abrangente desta proteína em diferentes neoplasias pode auxiliar a estabelecer o seu papel como um biomarcador.

#### **2.4.2 Deficiência das Proteínas de Reparo de *Mismatch* (dMMR) e Instabilidade de Microssatélite (MSI-H)**

As neoplasias surgem a partir de alterações no DNA e possuem, tipicamente, diferentes tipos de mutações somáticas. Eventualmente, os mecanismos de reparo aos danos causados no DNA estão comprometidos, acarretando no acúmulo de mutações <sup>65</sup>. Um exemplo disso é a deficiência dos mecanismos de reparo de DNA do tipo *mismatch* (dMMR), que decorre de mutações somáticas ou germinativas nos genes que codificam as proteínas de reparo de *mismatch* (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2), responsáveis por reconhecer e corrigir os erros no DNA <sup>66</sup>. Desta maneira, a dMMR leva ao acúmulo de mutações nos microssatélites, pequenas regiões com sequências repetidas de pares de base no DNA, acarretando instabilidade destes microssatélites (MSI) <sup>65</sup>.

A MSI-H ou a dMMR podem estar presentes em diversas neoplasias. Em decorrência do fenótipo hipermutado, os tumores com MSI-H possuem outras particularidades histopatológicas como a presença do infiltrado linfocitário exuberante, maior formação de

neoantígenos e maior expressão dos *checkpoints* imunológicos (PD-1 e PD-L1), tornando a imunoterapia uma estratégia interessante nestas neoplasias <sup>67</sup>. A incidência da MSI-H ou dMMR é de aproximadamente 31% nas neoplasias de endométrio, 20% no adenocarcinoma de cólon, 20% no adenocarcinoma gástrico e menos de 5% nos demais tumores <sup>68</sup>.

Le et al. <sup>69</sup> conduziram um estudo de fase 2 (KEYNOTE-016) para avaliar a eficácia do pembrolizumabe (anti-PD-1) em 41 pacientes com carcinoma metastático com deficiência (dMMR) ou proficiência do MMR (pMMR). Na coorte de carcinoma colorretal (CCR), os pacientes com dMMR a TRO foi de 40% e a SG mediana não foi atingida, enquanto que entre aqueles com pMMR a TRO foi de 0% e a SG mediana de 5 meses <sup>69</sup>. Em uma análise de 5 estudos prospectivos, incluindo o estudo KEYNOTE-016 citado anteriormente, 149 pacientes com o diagnóstico de neoplasias com MSI-H/dMMR (90 pacientes com CCR e 59 pacientes com outros tipos de tumores) foram tratados com o pembrolizumabe <sup>67</sup>. A TRO alcançada com o ICI foi de 39,6%, sendo que 7% dos pacientes atingiram a resposta completa. A duração de resposta foi maior que 6 meses em 78% dos pacientes respondedores <sup>67</sup>. Desta forma, o FDA aprovou, de maneira inédita, o pembrolizumabe para o tratamento do câncer com MSI-H ou dMMR independentemente do tipo histológico, representando a primeira aprovação de uma medicação baseada em um biomarcador.

Recentemente, o estudo de fase 3 KEYNOTE 177 demonstrou superioridade do pembrolizumabe em relação à quimioterapia no tratamento de primeira linha de pacientes portadores de CCR metastático com dMMR/MSI-H<sup>70</sup>. O anti-PD-1 reduziu em 40% o risco de progressão de doença ou óbito e praticamente dobrou a SLP mediana em comparação com a quimioterapia (16,5 meses vs 8,2 meses; HR=0,60; IC95%=0,45-0,80; p=0,0002). Além disso, o pembrolizumabe proporcionou taxas de resposta superiores (43,8% vs 33,1%) e a incidência de efeitos adversos graves foi consideravelmente menor (56% vs 78%) <sup>70</sup>.

### 2.4.3 Carga Mutacional Tumoral (TMB)

O câncer é considerado uma doença genômica decorrente de acúmulos de mutações germinativas e somáticas. A frequência de tais mutações difere entre as neoplasias e os subtipos histológicos. As neoplasias que apresentam as maiores cargas mutacionais somáticas são: melanoma, CPCNP, câncer de bexiga, adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma de esôfago e tumores colorretais <sup>71</sup>. A maior carga mutacional pode estar relacionada com a exposição a fatores carcinogênicos, como o cigarro, no câncer de pulmão, e os raios ultravioletas, no melanoma <sup>72</sup>.

As mutações não-sinônimas alteram os resíduos de aminoácidos de uma proteína, criando novos epítomos (neoepítomos) que podem servir como neoantígenos capazes de desencadear uma resposta imune antitumoral. Portanto, cada mutação não-sinônima pode gerar neoantígenos imunogênicos. Assim, a carga mutacional tumoral, em particular as mutações não-sinônimas, reflete indiretamente o número de neoantígenos potencialmente gerados no tumor e pode ser utilizado como um biomarcador preditivo de resposta à imunoterapia <sup>65</sup>.

O WES é o método mais utilizado nas pesquisas acadêmicas para estabelecer o TMB. No entanto, o WES é um teste financeiramente oneroso e que demanda tempo para a sua realização, tornando-o pouco viável para o emprego em larga escala na prática clínica. O NGS, por sua vez, demonstrou ser uma ferramenta robusta em estimar a carga mutacional em várias neoplasias e possui as vantagens de ser uma técnica mais acessível, barata e rápida que o WES <sup>72</sup>.

Em melanoma, diversos estudos associam o alto TMB com melhores desfechos clínicos com a imunoterapia. Em uma análise retrospectiva de uma coorte de pacientes com melanoma tratados com imunoterapia, Johnson et al. <sup>73</sup> demonstraram que o alto TMB, definida como mais de 23,1 mutações/Megabase (Mb) por sequenciamento de nova geração (NGS), esteve relacionada com aumento na TRO, SLP e SG.

Morrison et al. <sup>74</sup> avaliaram a carga mutacional por *whole exome sequencing* (WES) em pacientes com melanoma que receberam ipilimumabe e reportaram que o alto TMB (>7,1 mutações/Mb) associou-se com benefício em TRO, mas não em SG. Além disso, a redução na carga de mutações e de neoantígenos no tumor, comparada com os níveis basais pré-nivolumabe, parece ter associação com o aumento na taxa de resposta no melanoma <sup>75</sup>.

No CPCNP, os pacientes portadores de tumores com alta carga de mutação somática não-sinônima (>178 mutações) experimentaram um maior benefício clínico com o pembrolizumabe quando comparados com aqueles com baixa carga. Tanto a TRO quanto a SLP foram superiores na coorte com alta carga mutacional (TRO: 63% versus 0%,  $p=0,03$ ; SLP: 14,5 versus 3,7 meses,  $p=0,01$ ) <sup>76</sup>.

O estudo KEYNOTE 016, que comprovou a eficácia do pembrolizumabe nos pacientes com CCR com dMMR, avaliou a carga mutacional por WES e demonstrou que nos tumores com dMMR a média de mutações somáticas foi de 1.782 mutações/Mb, ao passo que nas neoplasias com pMMR a média foi de 73 mutações/Mb. A alta carga de mutação somática no grupo com dMMR traduziu-se em uma maior SLP <sup>69</sup>.

Uma recente metanálise analisou 26 estudos que avaliaram os ICIs em diversas neoplasias. Os pacientes que apresentavam alto TMB beneficiaram-se da imunoterapia tanto em SG (HR=0,53; IC95% 0,42-0,67) quanto em SLP (HR=0,52; IC95% 0,40-0,67) comparado com os indivíduos com baixa carga mutacional<sup>77</sup>. Além disso, no grupo com alto TMB, a imunoterapia também foi superior à quimioterapia em SG (HR=0,69; IC95% 0,50-0,95) e SLP (HR=0,66; IC95% 0,47-0,92). O mesmo benefício não foi observado nos pacientes com baixo TMB<sup>77</sup>. Samstein et al.<sup>78</sup> avaliaram a carga mutacional de 1.662 pacientes com câncer avançado tratados com ICI e observaram que o alto TMB associou-se a um melhor desfecho em SG na maioria das neoplasias.

A carga mutacional analisada no sangue parece ser um biomarcador adequado para avaliar o potencial da imunoterapia no tratamento do câncer. No estudo MYSTIC, Rizvi et al.<sup>79</sup> demonstraram que TMB elevado avaliado no sangue ( $\geq 20$  mut/Mb) esteve associado a um aumento significativo na SG de pacientes com CPCNP metastático tratados com a combinação de durvalumabe e tremelimumabe em relação aos doentes que receberam quimioterapia. Tal ganho não foi observado no subgrupo de pacientes com a carga mutacional  $< 20$  mut/Mb. Embora o emprego da avaliação de TMB no sangue como um biomarcador na prática clínica precise ser validado em estudos prospectivos, tal técnica é interessante para a análise das mutações clonais, considerando-se a heterogeneidade tumoral, além da facilidade na obtenção do material biológico<sup>79</sup>.

Os dados da literatura sugerem que o TMB é um biomarcador preditivo robusto na identificação de pacientes que possam beneficiar-se do tratamento com o ICI. Recentemente, o FDA aprovou o emprego do pembrolizumabe no tratamento de qualquer tumor sólido com alto TMB, baseado no estudo KEYNOTE-158<sup>80</sup>. Este estudo incluiu os pacientes com neoplasias em estágios avançados, incuráveis e previamente tratadas. Os tumores elegíveis para este estudo foram: canal anal, colo de útero, CPCP, endométrio, glândulas salivares, mesotelioma, neuroendócrino, tireóide, vias biliares e vulva. Os pacientes com alta carga mutacional tumoral, definida como mais de 10 mutações por megabase (Mb) pelo *FoundationOne CDx*, alcançaram uma taxa de resposta com o anti-PD-1 de 29%, enquanto que aqueles com baixo TMB ( $< 10$  mut/Mb) a TR foi de 6%<sup>80</sup>. Entretanto, o benefício clínico do anti-PD-1 não foi observado em todos os subtipos tumorais, como nas coortes de canal anal, vias biliares e mesotelioma, levantando-se a hipótese de que o limiar estabelecido para dicotomizar a carga mutacional não possui o mesmo impacto clínico para os diferentes diagnósticos. É importante ressaltar que neoplasias com alta incidência como mama, próstata, CCR e CPCNP não foram incluídos neste estudo<sup>80</sup>. Portanto, mais estudos são necessários

para estabelecer o melhor ponto de corte para a estratificação da carga mutacional (alta, intermediária e baixa) para cada neoplasia.

#### 2.4.4 O Sistema HLA

O sistema antígeno leucocitário humano (HLA), a versão humana do MHC, é a raiz da resposta imune adaptativa, atuando como a estrutura por trás da apresentação de antígeno. Assim, a compreensão das diferentes interações entre HLA e tumores pode ser importante na identificação de possíveis biomarcadores. Os genes HLA que estão envolvidos na resposta imune dividem-se em três classes distintas, I, II e III, que são estruturalmente e funcionalmente diferentes, sendo que as moléculas de classe I e II são as que apresentam maior relevância na apresentação antigênica <sup>81</sup>. Os genes da classe I são expressos na maioria das células somáticas, ao passo que os genes da classe II normalmente são expressos apenas em um subgrupo de células imunes que incluem as células B, células T ativadas, macrófagos, DCs, células epiteliais tímicas e outras células que estão sob a influência do IFN-gama <sup>81</sup>.

Johnson et al. <sup>82</sup> demonstraram que a expressão do HLA-DR no melanoma foi um fator preditivo de resposta à terapia anti-PD1. Dos 30 pacientes avaliados, 14 foram HLA-DR positivo e, entre eles, 11 obtiveram resposta após receberem o anti-PD1 (79%). O MHC-I, utilizando o HLA-A como protótipo, foi expresso de forma ubíqua e não foi associado à resposta ao tratamento <sup>82</sup>.

O papel do HLA-B e C, assim como a expressão do MHC-II em outros tumores e seu valor preditivo, ainda está sendo investigado <sup>83,84</sup>.

#### 2.4.5 Microbioma

Os microorganismos comensais do microbioma intestinal possuem um papel fundamental na modulação da resposta imune inata e adaptativa local e sistêmico <sup>85</sup>. Evidências na literatura sugerem uma forte associação entre a composição e diversidade da microbiota intestinal com a eficácia dos ICIs no tratamento dos pacientes oncológicos <sup>35</sup>.

Em um pequeno estudo prospectivo francês, a microbiota intestinal basal enriquecida pelos gêneros *Faecalibacterium* e outros membros da família *Firmicutes*, comparada com a microbiota composta por *Bacteroides*, proporcionou melhores resultados em termos de SLP, SG e benefício clínico com o ipilimumabe em pacientes portadores de melanoma metastático <sup>86</sup>. Contudo, a incidência de colite imunomediada foi significativamente maior nos pacientes com a microbiota intestinal composta por *Faecalibacterium* e outros *Firmicutes* <sup>86</sup>.

Posteriormente, um outro estudo prospectivo conduzido pelo grupo do MD. Anderson Cancer Center avaliou a associação da microbiota intestinal nos pacientes com melanoma tratados com o anti-PD1. Corroborando os dados previamente reportados por Chaput et al.<sup>86</sup>, os pacientes não respondedores apresentaram a microbiota intestinal enriquecida por espécies de *Bacteroides*, ao passo que a abundância de espécies de *Faecalibacterium* e a alta diversidade da microbiota associaram-se com o benefício clínico da imunoterapia e aumento na SLP<sup>87</sup>. Em um outro estudo, Matson et al.<sup>88</sup> relataram um predomínio de determinadas espécies bacterianas na microbiota intestinal basal, como *Bifidobacterium longum*, *Collinsella aerofaciens* e *Enterococcus faecium*, de pacientes com melanoma e que responderam aos ICIs. A análise de amostras de fezes coletadas pré-imunoterapia de 100 pacientes (60 CPCNP e 40 CCR) identificou a presença da *Akkermansia muciniphila* nos indivíduos que responderam à imunoterapia<sup>89</sup>.

As interações dos microrganismos comensais intestinais com o sistema imunológico e os impactos sobre os desfechos da imunoterapia são complexos e precisam ser analisados com cautela, uma vez que uma gama de fatores intrínsecos e extrínsecos podem enviesar tais relações.

#### **2.4.6 Infiltrado Linfocitário Tumoral (TIL)**

A presença do infiltrado linfocitário tumoral (TIL) tem sido consistentemente associado com melhores desfechos clínicos em inúmeras neoplasias, como nas neoplasias colorretais, melanoma e CPCNP<sup>30</sup>.

No CPCNP, altos níveis de TIL CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> conferem bom prognóstico em termos de sobrevida, ao passo que as células T FOXP3<sup>+</sup> estão associadas a piores desfechos clínicos<sup>90,91</sup>. Em melanoma, uma metanálise demonstrou que o TIL CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, FOXP3<sup>+</sup> e CD20<sup>+</sup> foi um fator prognóstico favorável para sobrevida<sup>92</sup>.

Em pacientes com melanoma e CPCNP tratados com ICI, os níveis basais de linfócito T CD8<sup>+</sup> na margem invasiva do tumor foram maiores nos respondedores em relação aos não respondedores<sup>39</sup>. Em um estudo que avaliou a associação entre a composição do TIL e a resposta ao pembrolizumabe em pacientes com melanoma metastático, a redução nas dimensões das lesões com o anti-PD1 esteve diretamente relacionada com a presença de células T CD8<sup>+</sup> nas margens do tumor<sup>93</sup>.

No estudo de fase II que avaliou o ipilimumabe no tratamento do melanoma metastático, o aumento na densidade do TIL nas amostras teciduais obtidas após a segunda aplicação da medicação, em relação as amostras de biópsias pré-tratamento, esteve associado

a um benefício clínico significativo com o anti-CTLA4<sup>94</sup>. Riaz et al.<sup>75</sup> também demonstraram um aumento significativo nos níveis de infiltrado linfocitário em relação a avaliação basal (pré-ICI) naqueles indivíduos com melanoma respondedores ao nivolumabe. Entretanto, tal elevação no TIL foi observado apenas no subgrupo de pacientes que não havia recebido ipilimumabe previamente<sup>75</sup>.

Estudos recentes sugerem que, além da densidade e localização do TIL, o fenótipo imune do tumor também influencia no desfecho com o ICI<sup>35</sup>. O perfil “imuno-inflamado” é caracterizado pela presença das células T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> no parênquima tumoral, expressão de PD-L1 e outros *checkpoints* imunes no microambiente do tumor e, conseqüentemente, apresenta melhores respostas aos ICIs<sup>35</sup>. Já no fenótipo imuno-excluído, a ativação de determinadas vias de sinalização, como *Wingless-related integration site* (WNT)-β catenina e do fator de crescimento transformador beta (TGF-β), promove a exclusão das células T CD8<sup>+</sup> do parênquima tumoral, podendo acarretar resistência aos imunoterápicos<sup>35</sup>. Finalmente, nas neoplasias com o fenótipo “deserto imune”, a ausência de células T tanto no parênquima quanto no estroma tumoral torna a ação da imunoterapia pouco eficaz<sup>35</sup>. Neste outro estudo, a análise fenotípica do TIL nas amostras de pacientes com CPCNP tratados com nivolumabe evidenciou que a alta expressão de PD1 na superfície dos linfócitos correlacionou-se positivamente com a sobrevida e resposta ao anti-PD1. Curiosamente, as amostras com alta expressão de PD1 no infiltrado linfocitário também apresentaram hiperexpressão de receptores inibidores associados à exaustão celular, hiperregulação de genes envolvidos nas vias de divisão celular e ciclo celular (expansão clonal), aumento no consumo da glicose e secreção constitutiva da quimiocina CXCL13<sup>95</sup>.

A imuno-histoquímica/imunofluorescência multiplex (IHQ/IFm) é um método eficaz utilizado para avaliar o microambiente tumoral, permitindo identificar determinadas proteínas ou alterações moleculares nas células que compõem o tumor, bem como a sua distribuição espacial<sup>96</sup>. A vantagem desta técnica é permitir a avaliação de diversos marcadores proteicos e moleculares em um único corte tecidual. Em uma recente metanálise, a IHQ/IFm apresentou um desempenho superior em prever resposta à imunoterapia que a expressão de PD-L1, perfil de expressão gênica e TMB, isoladamente<sup>97</sup>.

A identificação e a mensuração das subpopulações dos TILs podem ser úteis em prever resposta ou avaliar o efeito imune local dos inibidores de *checkpoints* imunes.

#### **2.4.7 Assinaturas de Expressão Gênica como Biomarcadores**

Evidências de alguns estudos sugerem que o perfil de expressão gênica do tumor pode ser um importante biomarcador preditivo de resposta aos ICIs. Em uma análise retrospectiva de um estudo de fase 2, a análise de expressão gênica foi realizada em amostras teciduais de 45 pacientes diagnosticados com melanoma e tratados com o ipilimumabe. As biópsias foram realizadas antes e após o início do tratamento. Nesse estudo, a alta expressão basal de genes relacionados à resposta imune esteve associada com resposta à imunoterapia. Além disso, após a aplicação do ipilimumabe, observou-se que o aumento na expressão dos genes *CXCL11* e *CXCR3* teve correlação com a sobrevida desses pacientes <sup>98</sup>.

Ribas et al. <sup>99</sup> avaliaram as amostras de 19 pacientes com melanoma tratados com pembrolizumabe para investigar a relação de duas assinaturas gênicas (*Interferon-gamma 10-gene* e o *expanded-immune 28-gene*) com a resposta imune. As duas assinaturas correlacionaram-se com TR e SLP. Posteriormente, tais assinaturas gênicas, *interferon-gamma* (IFN- $\gamma$ ) e *expanded-immune gene*, foram refinadas e validadas em pacientes com neoplasia gástrica e de cabeça e pescoço expostos ao pembrolizumabe. Ambas as assinaturas mostraram uma associação positiva e estatisticamente significativa com os desfechos clínicos (TR e SLP) nas duas coortes <sup>100</sup>.

No estudo de fase II POPLAR, que avaliou o tratamento com o atezolizumabe (anti-PD-L1) em pacientes com câncer de pulmão metastático após falha a quimioterapia baseada em platina, os pesquisadores analisaram o perfil de expressão gênica tumoral através da plataforma *Fluidigm based* (Fluidigm; South San Francisco, CA, USA) <sup>101</sup>. As assinaturas de célula T efetora e de interferon- $\gamma$  foram baseadas na expressão dos seguintes genes: *CD8A*, *GZMA*, *GZMB*, *IFN $\gamma$* , *EOMES*, *CXCL9*, *CXCL10* e *TBX21*. Tais genes estão relacionados com a ativação de células T, atividade imune citolítica e expressão de interferon- $\gamma$ . A expressão desses genes foi relacionada a um benefício em sobrevida global (HR=0,43; IC95% 0,24–0,77) <sup>101</sup>. Além disso, as assinaturas de célula T efetora e interferon- $\gamma$  também apresentaram correlação com a expressão do PD-L1 em células imunes do infiltrado tumoral, indicando a pré-existência de uma resposta imune adaptativa no tecido neoplásico <sup>101</sup>.

#### 2.4.8 Mutações de Genes Específicos como Biomarcadores

Apesar dos ICIs terem revolucionado o tratamento de inúmeras neoplasias, proporcionando um aumento na taxa de resposta e sobrevida dos pacientes, a maioria dos doentes não se beneficia desta modalidade terapêutica. Nesse sentido, as mutações somáticas em genes específicos podem estar envolvidas na resistência primária ou adquirida aos imunoterápicos.

No adenocarcinoma de pulmão *KRAS* mutado, a mutação concomitante do *STK11/LKB1* foi um fator preditivo de resistência ao anti-PD1. Apenas 7,4% dos pacientes com a alteração do gene *STK11/LKB1* responderam ao ICI, ao passo nos indivíduos *STK11/LKB1* selvagem a TRO foi de 28,6% <sup>102</sup>. A SLP e a SG dos pacientes *STK11/LKB1* mutados também foram significativamente inferiores <sup>102</sup>.

A perda bialélica do gene *PTEN* foi associada à resistência adquirida ao pembrolizumabe em uma paciente portadora de leiomiossarcoma uterino metastático que evoluiu com progressão de doença após dois anos de resposta completa ao anti-PD1 <sup>103</sup>. Em melanoma, a perda do *PTEN* também esteve associada com piores desfechos clínicos ao anti-PD1 e pode ser uma via de resistência à imunoterapia <sup>104</sup>. Além disso, as mutações com perda de função nos genes *JAK1/JAK2* ou *B2M* parecem estar envolvidas nos mecanismos de escape à imunoterapia <sup>105</sup>.

#### 2.4.9 Biomarcadores no Sangue Periférico

Atualmente, os biomarcadores mais robustos para prever resposta à imunoterapia são avaliados em amostras de tecido tumoral, como a expressão de PD-L1 e o TMB. Entretanto, a realização destes testes possui diversas dificuldades como a necessidade de um procedimento invasivo para a obtenção da amostra e os riscos de complicações inerentes, os custos financeiros e a disponibilidade limitada dos tecidos parafinados. Neste contexto, a avaliação de biomarcadores prognósticos e preditivos no sangue periférico é extremamente interessante, uma vez que a obtenção do material biológico é relativamente simples e menos invasiva, há possibilidade da avaliação cronológica e longitudinal do marcador, além dos custos serem mais baixos.

Diversos componentes do sangue periférico já foram avaliados e apresentaram associações com a resposta aos ICIs, como a contagem total de linfócitos, contagem total de neutrófilos, contagem de monócitos/células supressoras derivadas da linhagem mieloide, contagem de eosinófilos, níveis de desidrogenase láctica, clonalidade e diversidade de receptores de células T, níveis de citocinas circulantes (interleucina 6 e 8), entre outros <sup>35,106</sup>.

O estado inflamatório desencadeado pelo tumor está diretamente relacionado com o prognóstico das neoplasias <sup>106</sup>. A relação neutrófilo-linfócito (NLR) é um parâmetro indicativo de inflamação sistêmica, e a alta NLR está atrelada a um pior prognóstico nos tumores sólidos <sup>107</sup>. O impacto da NLR nos desfechos da imunoterapia foi demonstrado em uma metanálise que incluiu 27 estudos e analisou os dados de 4.647 pacientes com neoplasias em estágio avançado <sup>108</sup>. Neste estudo, Jiang et al. <sup>108</sup> reportaram que a alta NLR impactou negativamente na SG e SLP dos pacientes tratados com imunoterapia. Recentemente, Valero et al. <sup>109</sup> demonstraram que os pacientes com alta NLR pré-imunoterapia tiveram uma menor resposta e sobrevida, independente do tipo de tumor. De maneira semelhante, em CPCNP a alta NLR antes da imunoterapia também esteve associado com resultados inferiores em SLP e SG em relação a baixa NLR <sup>110</sup>.

As células circulantes tumorais (CTCs) são células originadas do tumor primário ou metastático e são lançadas no sistema circulatório através dos vasos sanguíneos, podendo ser capturadas para a análise molecular. A identificação de CTCs antes ou durante a imunoterapia foi um fator preditivo de pior resposta e impactou negativamente na sobrevida de pacientes com CPCNP <sup>111,112</sup>. Além disso, a presença de PD-L1<sup>+</sup> nas CTCs pré-tratamento também foi um fator de pior prognóstico<sup>111</sup>. Em contrapartida, em melanoma, os pacientes tratados com o pembrolizumabe e que apresentaram a expressão de PD-L1 nas CTCs obtiveram benefício em SLP em relação aos que não expressaram a PD-L1 <sup>113</sup>.

A avaliação do DNA circulante tumoral (ctDNA) no sangue periférico possibilita a identificação de mutações somáticas no tumor de maneira menos invasiva e tem sido estudado como um potencial biomarcador no tratamento com os ICIs. Em um estudo de fase 2, a baixa concentração do ctDNA basal esteve associada com uma resposta e sobrevida significativamente maiores com a administração de pembrolizumabe <sup>114</sup>. Além disso, durante o curso do tratamento, a depuração do ctDNA até tornar-se indetectável correlacionou-se com melhores desfechos clínicos <sup>114</sup>.

## **2.5 ASPECTOS ECONÔMICOS DA IMUNOTERAPIA**

Os imunoterápicos, particularmente os ICIs, rapidamente tornaram-se importantes armas dentro do arsenal de terapias oncológicas. No Brasil, atualmente, estão aprovadas pela ANVISA as seguintes medicações: nivolumabe, pembrolizumabe e cemiplimabe (anti-PD1), atezolizumabe, durvalumabe e avelumabe (anti-PD-L1), e ipilimumabe (anti-CTLA4) (Tabela 1).

Entretanto, uma grande preocupação em relação aos ICIs está na esfera financeira, uma vez que o custo médio anual do tratamento com o ICI no câncer de pulmão é de, aproximadamente, R\$100 mil por paciente <sup>115</sup>. Estima-se que os gastos com o câncer alcançarão \$173 bilhões em 2020, nos Estados Unidos. Já no Brasil, segundo o Tribunal de Contas da União, os investimentos federais em oncologia aumentaram de 0,81 para 1,92 bilhões de reais entre 2002 e 2010, sendo que 74% dos gastos foram destinados para os quimioterápicos <sup>116</sup>.

Um recente estudo brasileiro revelou que o uso do nivolumabe no tratamento de segunda linha de CPCNP metastático acarretará um custo adicional de 332 milhões de dólares por ano, correspondendo a um aumento de 31,1% no orçamento destinado para a aquisição de drogas antineoplásicas <sup>115</sup>. Neste mesmo estudo, entretanto, os ICIs demonstraram um benefício em custo-eficácia, tanto na primeira linha (pembrolizumabe e PD-L1>50%) quanto na segunda linha (nivolumabe) de tratamento dos pacientes com neoplasia de pulmão<sup>115</sup>. Em melanoma, o nivolumabe também demonstrou ser custo-eficaz em monoterapia, mas não em combinação com o ipilimumabe <sup>117</sup>. Em uma recente metanálise, apenas o pembrolizumabe foi custo-eficaz em CPCNP, ao passo que no melanoma tanto o nivolumabe quanto o pembrolizumabe obtiveram tal benefício <sup>118</sup>.

O alto custo financeiro dos imunoterápicos agrega um impacto econômico negativo na sustentabilidade do sistema de saúde, tornando o emprego indiscriminado destas drogas uma prática proibitiva em diversos países de baixa e média renda <sup>115,118</sup>. A identificação de biomarcadores para selecionar os pacientes com o real benefício aos ICIs, o debate entre a sociedade civil, operadoras de planos de saúde, oncologistas e as indústrias farmacêuticas no sentido de minimizar os custos dos remédios, e a criação de políticas públicas que promovam o acesso global e sustentável aos imunoterápicos são indispensáveis.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a associação entre os desfechos clínicos (resposta e sobrevida) dos pacientes portadores de melanoma e CPCNP metastáticos tratados com nivolumabe ao perfil de expressão de genes relacionados à resposta imune inata e adaptativa e a composição do infiltrado imune tumoral.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a resposta ao tratamento de pacientes portadores de CPCNP e melanoma tratados com o nivolumabe, de acordo com RECIST 1.1;
- Avaliar a sobrevida livre de progressão (SLP) e a sobrevida global (SG) de pacientes portadores de CPCNP e melanoma tratados com o nivolumabe (anti-PD-1);
- Avaliar a expressão de 41 genes relacionados à inflamação e resposta imune em amostras tumorais parafinadas por RT-qPCR (PCR de transcrição reversa quantitativa) usando a plataforma TLDA (*Taqman Low Density Array - Life Technologies*);
- Avaliar a expressão de proteínas no infiltrado linfocitário tumoral pela técnica de imunofluorescência multiplex;
- Correlacionar os perfis de expressão gênica e o padrão de infiltrado inflamatório com a resposta ao tratamento com o nivolumabe.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Este estudo baseia-se em uma análise de coorte retrospectiva de casos de melanoma e CPCNP metastáticos tratados com nivolumabe dentro dos respectivos Programas de Acesso Expandido (EAP) (CA 209-168 e CA 209-169) entre novembro de 2014 a janeiro de 2016 no A.C.Camargo Cancer Center.

Posteriormente, com o intuito de aumentar a população do estudo, em decorrência de perdas relacionadas com disponibilidade de material arquivado e de rendimento e qualidade do RNA extraído para análise de expressão gênica, também foram incluídos pacientes portadores de CPCNP e melanoma metastáticos tratados com o nivolumabe em segunda linha ou em linhas posteriores, fora do EAP, entre fevereiro de 2016 a dezembro de 2017 no A.C.Camargo Cancer Center. A seleção destes pacientes obedeceu a ordem cronológica de aplicação da medicação na instituição. A inclusão destas amostras foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) e pelo patrocinador deste estudo.

#### 4.1.1 Critérios de Inclusão

Os critérios de inclusão no EAP na coorte de CPCNP foram:

- Diagnóstico de CPCNP (escamoso ou não escamoso) metastático confirmado histologicamente;
- ECOG 0, 1 ou 2;
- Tratamento prévio com inibidor de tirosina-quinase (TKI) na presença da mutação de *EGFR* ou rearranjo de *ALK* ou quimioterapia baseada em platina para doença metastática.

Os critérios de inclusão no EAP na coorte de melanoma foram:

- Diagnóstico de melanoma cutâneo metastático ou recorrente;
- ECOG 0 ou 1;
- Terapia prévia com o anti-CTLA4 (ipilimumabe) no cenário de doença metastática.

Os critérios de inclusão nas coortes de CPCNP e melanoma fora do EAP:

Coorte CPCNP:

- Diagnóstico de CPCNP (escamoso ou não escamoso) metastático confirmado histologicamente;
- ECOG 0, 1 ou 2;
- Tratamento prévio com inibidor de tirosina-quinase (TKI) na presença da mutação de *EGFR* ou rearranjo de *ALK* ou quimioterapia baseada em platina para doença metastática;
- Tratamento com nivolumabe a partir da segunda linha de tratamento para doença metastática.

Coorte melanoma:

- Diagnóstico de melanoma cutâneo metastático ou recorrente;
- ECOG 0 ou 1;
- Terapia prévia com anti-CTLA4 (ipilimumabe) no cenário de doença metastática;
- Tratamento com nivolumabe a partir da segunda linha de tratamento para doença metastática.

#### 4.1.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos desse estudo:

- Os pacientes que não receberam ao menos uma dose do nivolumabe;
- Melanoma de coroide;
- Pacientes cujas amostras teciduais em bloco de parafina eram escassas para o experimento ou não estavam disponíveis/armazenadas no setor de arquivos do Departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center..

## 4.2 COLETA E TABULAÇÃO DAS AMOSTRAS E DADOS

### 4.2.1 Seleção de Amostras de Tecidos Tumorais Fixados em Formaldeído e Emblocados em Parafina (FFPE)

Levantamos as amostras de tecido fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE) armazenadas no setor de arquivos do Departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center. Seleccionamos apenas as amostras provenientes de biópsias ou ressecções cirúrgicas de lesões primárias ou metastáticas realizadas imediatamente antes do paciente iniciar a terapia com o nivolumabe ou à época do diagnóstico e em cujos blocos continham

tecido tumoral suficiente para realização das análises subsequentes. Naqueles casos em que dois ou mais blocos de parafina do mesmo paciente estavam disponíveis, foi utilizado aquele em que o material foi obtido mais próximo do início do tratamento com o nivolumabe.

#### **4.2.2 Extração de DNA e RNA de Tecidos Tumorais Fixados em Formaldeído e Emblocados em Parafina (FFPE)**

As amostras de FFPE selecionadas foram obtidas do Arquivo do departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center. Para cada caso do estudo foram confeccionadas lâminas de hematoxilina & eosina que foram submetidas à análise histológica por um patologista (Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto) qualificado para a seleção e marcação da área de maior concentração de tecido tumoral. Foram realizados cortes seriados (8 cortes de 5 micra cada) do material para dissecação ou *scraping* da região do tecido previamente demarcada e, posteriormente, encaminhados para a extração de DNA e RNA. O procedimento de extração foi realizado no Laboratório de Macromoléculas seguindo os padrões operacionais previamente estabelecidos.

O processo de extração iniciou-se com a remoção da parafina utilizando o reagente *Desparafinization Solution* (Qiagen) e a digestão do tecido com proteinase K (Qiagen), conforme as instruções do fabricante para o kit de extração AllPrep DNA/RNA FFPE (Qiagen). No processamento da molécula de RNA e DNA foi feito o tratamento com *RNase - Free DNase Set Kit* (Qiagen) e *RNase A solution* (Qiagen), respectivamente.

As moléculas obtidas foram quantificadas no espectrofotômetro Qubit® usando o kit *QUANT-IT dsDNA HS assay* (Life Technologies) e *QUANT-IT RNA HS assay* (Life Technologies). A pureza do RNA e do DNA extraído foi obtida no espectrofotômetro - NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific).

O DNA e RNA extraídos foram armazenados em um *freezer* a -80°C até o momento do uso.

### **4.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA E AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO/IMUNE**

#### **4.3.1 Análise de Expressão por RT-qPCR na Plataforma TLDA**

O RNA extraído dos tecidos parafinados das coortes de CPCNP e melanoma, cujo rendimento tenha sido satisfatório (>200ng), foi utilizado para a análise de expressão gênica.

O rendimento e a concentração do RNA extraído foram distintos entre as amostras. Assim, a concentração de cada amostra foi normalizada em água ultra-pura livre de nucleases (*UltraPure™ Distilled Water*, Life Technologies) para uma concentração final de 12,5 ng/μL. A próxima etapa envolveu a conversão do RNA mensageiro em cDNA, através da reação de transcrição reversa pela enzima VILO IV (*SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit*, ThermoFisher Scientific), conforme a recomendação do fabricante, para se alcançar uma massa final de 100 ng de cDNA por amostra. Posteriormente, realizamos uma reação de pré-amplificação do cDNA obtido, seguindo o protocolo da *TaqMan PreAmp Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) e o produto da pré-amplificação foi submetido a diluição com H<sub>2</sub>O na proporção 1:5, conforme a recomendação do fabricante.

Os ensaios para analisar a expressão dos genes de interesse foram realizados por RT-qPCR (PCR de transcrição reversa quantitativa) usando a plataforma TLDA (*Taqman Low Density Array* - Life Technologies) (Figura 3). Nesta abordagem, foram customizados 48 ensaios TLDA em placas com 384 poços. Assim, foi possível avaliar simultaneamente em unicata o nível de expressão de 48 genes de 8 amostras distintas por placa. As placas TLDA foram customizadas contendo 41 genes-alvo (*CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL19, CCL21, CD247, CD274, CD3D, CD8A, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCR6, DDX58, EOMES, FOXP3, GATA3, GZMA, GZMB, HLA-DRA1, HLA-E-DRA1, IDO1, IFNG, IL10, IRF1, IRF3, IRF7, LAG3, MAVS, NKG7, PDCD1, PFR1, PTPRC, STAT1, TBX21, TGFB, TIGIT, TMEM17, TNFA*), 6 genes endógenos (*GAPDH, ACTB, BCR, GUSB, HPRT1, RPLP0*) e um gene normalizador (*18S ribosomal RNA*). Para cada reação foram usados aproximadamente 0,52 ng de cDNA em um volume total de 2 μL. Em cada placa oito amostras distintas foram analisadas e, portanto, foram encomendadas 10 unidades para este estudo. As placas TLDA foram personalizadas pela Thermo Fisher Scientific. As placas contendo os ensaios foram analisadas pelo *Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific), conforme recomendado pelo fabricante.

Os genes selecionados neste estudo estão envolvidos com a via de sinalização do interferon (*IFNG, IRF1, STAT1*), quimiotaxia de linfócitos (*CCL5, CCL19, CCL21, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCR6*), quimiotaxia de células mieloides (*CCL2, CCL3, CCL4*), exaustão (*CD274, IDO1, LAG3, PTPRC, TIGIT*), ativação e perfil fenotípico de linfócito (*CD3D, CD247, CD8A, EOMES, FOXP3, GATA3, TBX21, TGFB, TIGIT, TNFA, IL10, NKG7*), atividade citolítica (*GZMA, GZMB, PFR1*), apresentação de antígenos (*HLA-DRA1, HLA-E, IFNG, IRF1, IL10, LAG3, NKG7, PDCD1, PFR1, PTPRC, STAT1, TBX21, TGFB, TIGIT, TNFA*) e de receptores citoplasmáticos de RNA e DNA (*DDX58, MAVS, IRF3*,

*IRF7*) (Tabela 2). A escolha destes genes baseou-se em estudos previamente publicados que avaliaram a capacidade do GEP em prever a resposta ao tratamento com o ICI<sup>100,101,119</sup>.



Fonte: Adaptado de <https://www.thermofisher.com>

**Figura 3** – *TaqMan Array Card*. O *TaqMan Array Card* é um cartão customizado com 384 poços que possibilita reações simultâneas de RT-PCR. Neste ensaio, cada cartão foi possível incluir 8 amostras distintas para analisar a expressão de 48 genes, sendo 41 genes-alvo de interesse.

Com o intuito de selecionar os genes endógenos mais estáveis nas amostras estudadas, foi usado o programa de análise QBase<sup>+120</sup> que possui uma ferramenta *on line* denominada geNorm, disponível em <https://www.qbaseplus.com/>. O programa é capaz de calcular a medida de estabilização gênica (M), indicando os genes endógenos mais estáveis para serem utilizados como normalizadores. O valor de M sugerido pelo programa deve ser 1,5, abaixo do qual se tem os melhores genes endógenos. A estabilidade é determinada partindo-se do princípio de que dois genes normalizadores ideais possuem razões de expressão idênticas em todas as amostras de cDNA analisadas, independente das condições experimentais ou de tipos celulares. O valor médio dos genes mais estáveis foi utilizado para realizar o cálculo da expressão relativa de cada gene-alvo, baseado no modelo matemático descrito por Pfaffl et al.<sup>121</sup>. Nas coortes de CPCNP, os genes endógenos *ACTB*, *HPRT1* e *GUSB* foram utilizados como genes normalizadores, ao passo que no grupo de melanoma os genes selecionados foram *ACTB*, *RPLP0* e *HPRT1*.

A expressão diferencial dos genes selecionados foi determinada pelo método de quantificação relativa  $2\Delta Ct$ , que leva em conta a expressão do gene alvo em relação ao gene

normalizador. A expressão dos genes foi transformada em  $\log_2(x + 0,001)$  a fim de auxiliar os dados a adotarem uma distribuição normal, permitindo trabalhar com escalas lineares.

Para a análise dos dados de expressão gênica pelo TLDA, foram excluídas as amostras que tinham mais de 30% dos genes com falha de amplificação<sup>122</sup>.

**Tabela 2** – Relação dos genes selecionados para a análise do perfil de expressão gênica nas coortes de câncer de pulmão e melanoma, distribuídos conforme a função desempenhada pelas respectivas proteínas.

Função	Genes
Via de sinalização do interferon	<i>IFNG, IRF1, STAT1</i>
Quimiotaxia de linfócitos	<i>CCL5, CCL19, CCL21, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCR6</i>
Quimiotaxia de células mielóides	<i>CCL2, CCL3, CCL4</i>
Exaustão	<i>CD274, IDO1, LAG3, TIGIT</i>
Ativação e perfil fenotípico de linfócito	<i>CD3D, CD247, CD8A, EOMES, FOXP3, GATA3, TBX21, TGFB, TIGIT, TNFA, IL10, NKG7</i>
Atividade citolítica	<i>GZMA, GZMB, PFR1</i>
Apresentação de antígenos	<i>HLA-DRA1, HLAE, IFNG, IRF1, IL10, LAG3, NKG7, PDCD1, PFR1, PTPRC, STAT1, TBX21, TGFB, TIGIT, TNFA</i>
Receptores citoplasmáticos de RNA e DNA	<i>DDX58, MAVS, IRF3, IRF7</i>

#### 4.3.2 Validação da Assinatura de Expressão Gênica

Os conjuntos de genes cuja expressão demonstrou associação com a resposta ao ICI na coorte de CPCNP e na coorte de melanoma tiveram sua relevância preditiva validada em *datasets* de expressão gênica externos e independentes obtidos no repositório *Gene Expression Omnibus* (GEO). Para validação dos achados em CPCNP, empregamos os dados do estudo GEO GSE136961 que utilizou a plataforma *Oncomine Immune Response Research Assay* (Thermo Fisher) para avaliar a expressão de 395 genes em amostras de 21 pacientes com CPCNP tratados com anti-PD-1<sup>123</sup>. Para validação dos achados em melanoma empregamos os dados do estudo GSE93157 que utilizou a plataforma *PanCancer Immune Profiling (Nanostring nCounter)* para avaliar a expressão de 730 genes relacionados à resposta imune em amostras tumorais de 25 pacientes com melanoma tratados com nivolumabe<sup>124</sup>. Em ambos os estudos, as amostras tumorais foram coletadas antes do início do tratamento.

### **4.3.3 Análise do Infiltrado Inflamatório Tumoral por Imunofluorescência Multiplex (IFm)**

A análise do infiltrado linfocitário dos tecidos das coortes de CPCNP e melanoma foi realizada por IFm com o auxílio da tecnologia Zenon para conjugação de anticorpos primários a fluorocromos (Thermo Fisher Scientific).

Os anticorpos primários selecionados para o experimento foram específicos para as seguintes proteínas: CK7 (Thermo Fisher Scientific, IgG1 de camundongo, diluição 1:100), SOX-2 (Thermo Fisher Scientific, IgG de coelho, diluição: 1:50-1:100), CD3 (Thermo Fisher Scientific, IgG de coelho, diluição: 1:150), CD4 (Thermo Fisher Scientific, IgG de coelho, diluição: 1:50), CD8 (Thermo Fisher Scientific, IgG1 de camundongo, diluição: 1:50), CD20 (Thermo Fisher Scientific, IgG2a de camundongo, diluição: 1:100), PD-1 (Thermo Fisher Scientific, IgG1 de camundongo, diluição 1:100), PD-L1 (Thermo Fisher Scientific, IgG de coelho, diluição: 1:100), CD11c (Thermo Fisher Scientific, IgG2b de camundongo, diluição: 1:100), CD14 (Thermo Fisher Scientific, IgG de coelho, diluição 1:200), CD123 (Thermo Fisher Scientific, IgG1 de camundongo, diluição 1:100), CD163 (Thermo Fisher Scientific, IgG1 de camundongo, diluição 1:50), CD68 (Thermo Fisher Scientific, IgG1 de camundongo, diluição 1:100).

Cada anticorpo primário IgG foi incubado com um reagente de conjugação Zenon, composto por fragmentos Fab anti-região constante de IgG (Fc) com alta afinidade conjugados aos fluorocromos de interesse (Zenon -Thermo Fisher Scientific). Os reagentes marcados utilizados neste estudo foram: Zenon anti-Fc de camundongo Alexa Fluor (AF) 405, Zenon anti-Fc de coelho AF 405, Zenon anti-Fc de camundongo AF 488, Zenon anti-Fc de camundongo AF 555, Zenon anti-Fc de coelho AF 594, Zenon anti-Fc de camundongo AF 647, Zenon anti-Fc de coelho AF 647, Zenon anti-Fc de camundongo AF 700 e Zenon anti-Fc de coelho AF 750.

Para a realização da IFm, quatro cortes sequenciais de 4  $\mu$ m de espessura dos FFPE de cada amostra dos grupos de CPCNP e melanoma foram utilizados para a confecção das lâminas. Adicionalmente, cinco cortes de tecidos parafinados de tonsilas amigdalíneas foram obtidos para o grupo controle do experimento.

Inicialmente, os cortes foram submetidos aos processos de desparafinização e hidratação. Para a remoção da parafina, as lâminas foram imersas em um reservatório contendo xileno durante 5 minutos. Esse procedimento foi repetido três vezes em reservatórios distintos. A hidratação das lâminas foi obtida através da imersão das lâminas por 5 minutos, sequencialmente, em álcool absoluto (2 vezes), álcool 90 ° GL, álcool 80 ° GL, álcool 70 °

GL, álcool 50 ° GL, álcool 25 ° GL, água destilada e, finalmente, em PBS por 10 minutos. A reativação antigênica foi a próxima etapa do experimento, na qual as lâminas foram colocadas em um Becker preenchido com 500 mL de solução tampão de citrato (pH=6,0) e aquecidas no micro-ondas em baixa potência por 10 minutos após alcançar o ponto de ebulição. Após 15 minutos em temperatura ambiente, as lâminas foram retiradas da solução tampão e foram imersas em PBS durante 3 minutos, 3 vezes consecutivas. Posteriormente, foram distribuídos 250 µL de solução de bloqueio (PBS / 1% BSA / 0,1% Tween 20) diretamente sobre os tecidos, que foram totalmente cobertos por Parafilm. Na sequência, as lâminas foram incubadas durante 1 hora na câmara úmida, em temperatura ambiente.

A próxima etapa foi a conjugação dos anticorpos. Inicialmente, diluímos cada µg de anticorpo primário em PBS / 1% BSA para alcançar um volume final que não ultrapassasse 20 µL. Subsequentemente, foram acrescentados para cada 1 µg de anticorpo primário 5 µL da solução de marcação (porção Fab conjugada a fluorocromo) específica e incubados durante 5 minutos, a 25 °C, ao abrigo da luz. Posteriormente, 5 µL da solução de bloqueio IgG inespecífica foram adicionados em cada reação e incubados por mais 5 minutos em temperatura ambiente e protegidos da luz.

Conforme o perfil do infiltrado linfocitário a ser analisado, anticorpos foram combinados e num volume total de 250 µL dessa solução que foram posteriormente aplicados sobre os tecidos. As lâminas foram cobertas com Parafilm e incubadas *overnight* (16 a 18 horas), à 4 °C, em câmara úmida. Após retirar o Parafilm, as lâminas foram lavadas por imersão em PBS durante 5 minutos, em temperatura ambiente, por 4 vezes consecutivas, com troca da solução entre as lavagens. Finalmente, adicionamos 250 µL da solução de DAPI a 0,2 µg/mL nas lâminas, que foram cobertas com Parafilm e permaneceram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas por imersão em PBS durante 5 minutos por 4 vezes consecutivas.

O procedimento de montagem das lâminas envolveu a adição do meio de montagem (*Fluorescence Mounting Medium*, Dako) seguida da aplicação da lamínula sobre a lâmina. Após a secagem completa em temperatura ambiente, as lamínulas foram seladas com verniz e as lâminas ficaram armazenadas a -20 °C, ao abrigo da luz.

Os painéis de anticorpos foram previamente padronizados e testados inicialmente em cortes de amígdala e, posteriormente, nas amostras teciduais de câncer de pulmão e melanoma (Figuras 4 e 5).

	<b>Marcador</b>		<b>Marcador</b>
Núcleo	DAPI	Núcleo	DAPI
CK7	AF 555	CK7	AF 555
CD3	AF 647	CD4	AF 594
PD-1	AF 488	CD8	AF 488
PD-L1	AF 594	CD20	AF 647

	<b>Marcador</b>		<b>Marcador</b>
Núcleo	DAPI	Núcleo	DAPI
CK7	AF 555	CK7	AF 555
CD3	AF 594	CD3	AF 594
CD68	AF 488	CD11c	AF 488
CD163	AF 647	CD123	AF 647

**Figura 4** - Lista e agrupamento dos anticorpos selecionados para cada corte de tecido parafinado na coorte de CPCNP.

	<b>Marcador</b>		<b>Marcador</b>
Núcleo	DAPI	Núcleo	DAPI
SOX2	AF 555	SOX2	AF 555
CD3	AF 647	CD4	AF 594
PD-1	AF 488	CD8	AF 488
PD-L1	AF 594	CD20	AF 647

	<b>Marcador</b>		<b>Marcador</b>
Núcleo	DAPI	Núcleo	DAPI
SOX2	AF 555	SOX2	AF 555
CD3	AF 594	CD3	AF 594
CD68	AF 488	CD11c	AF 488
CD163	AF 647	CD123	AF 647

**Figura 5** - Lista e agrupamento dos anticorpos selecionados para cada corte de tecido parafinado na coorte de melanoma.

As imagens das lâminas de IFm foram capturadas em Microscópio Confocal Leica TCS SP8 e processadas no Leica AF *Hardware Configurator*, no Laboratório de Microscopia Confocal e Citometria de Fluxo da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP. Para cada lâmina, foram capturados 10 campos aleatórios na objetiva de 63X de aumento com imersão.

#### 4.3.4 Quantificação do Infiltrado Inflamatório/Imune

As imagens serão analisadas utilizando o *software* ImageJ 1.53v (NIH, Bethesda, MD, EUA). A quantificação de infiltrado será feita por contagem de células positivas e pela intensidade média de fluorescência para cada marcador. Além disso, análises de colocalização serão realizadas com o auxílio dos plug-ins Coloc 2 e JACoP, conforme previamente descrito<sup>125</sup>.

#### 4.4 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

As informações clínicas dos pacientes como idade, gênero, raça, hábitos de risco, tamanho da lesão, estágio clínico, linhas de tratamento, data de progressão, sítios de metástases, sobrevida e seguimento foram coletados e revisados retrospectivamente dos prontuários eletrônicos, sendo tabulados posteriormente.

A resposta ao tratamento com o nivolumabe foi avaliada por RECIST 1.1 e os pacientes foram classificados como respondedores (R), definido como resposta completa (RC), resposta parcial (RP) e doença estável (DE) sustentada por mais de 6 meses, ou não respondedores (NR), que incluiu os pacientes com DE menor que 6 meses e progressão de doença (PD). A definição de resposta foi baseada nas informações obtidas nos prontuários eletrônicos ou nos laudos de tomografia computadorizada, ressonância magnética ou PET-CT (tomografia por emissão de pósitrons-tomografia computadorizada).

A sobrevida livre de progressão (SLP) foi definida como o tempo entre a primeira administração do nivolumabe até a PD ou morte. A sobrevida global (SG) foi considerada como o tempo entre a primeira administração do nivolumabe até a morte por qualquer causa.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, a análise descritiva das variáveis foi realizada para sintetizar as características dos pacientes. As distribuições de frequência absoluta (n) e relativa (%) foram aplicadas para as variáveis qualitativas, e as medidas de dispersão e de tendência central como média, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo para as variáveis quantitativas.

A fim de avaliar a associação entre as variáveis qualitativas, o teste de independência qui-quadrado de Pearson (ou teste exato de Fisher quando apropriado) foi aplicado. A associação entre uma variável quantitativa com uma variável qualitativa foi testada através do

teste não-paramétrico U de Mann-Whitney bicaudal ou do teste de Kruskal-Wallis, quando apropriado. O poder de predição de resposta ao nivolumabe de variáveis quantitativas foi avaliado por meio da regressão logística e pelo cálculo da área sob a curva (AUC) característica de operação do receptor (ROC).

Na análise de sobrevida (SG e SLP), o método de Kaplan-Meier foi utilizado para estimar o tempo até o desfecho e ilustrar as curvas de sobrevida, assim como o teste log-rank foi aplicado para a comparação entre as curvas de sobrevida. Modelos de riscos proporcionais de Cox foram empregados para avaliar a influência das variáveis independentes nos desfechos. Para a análise multivariada, a comparação da SG de pacientes com alto e baixo valor da assinatura gênica foi ajustada para as variáveis previamente estabelecidas, com entrada forçada no modelo.

O nível de significância adotado foi de 5%. Desta forma, os resultados com valores  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Para a construção de assinaturas de expressão gênica selecionamos genes com  $p < 0,1$  no teste de Mann-Whitney e na regressão logística. Adotamos um nível de significância de 10%, nesse caso, a fim de possibilitar a integração de resultados de duas abordagens matemáticas complementares, sem tornar o critério de seleção por demais restritiva.

As análises foram conduzidas separadamente para as amostras de melanoma e de CPCNP.

O software IBM SPSS versão 25 e o software R 3.6.2 foram utilizados nas análises dos dados.

#### **4.6 COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA (CEP)**

Os EAPs foram aprovados pelo comitê de ética local e pelo Conselho Nacional de Ensino e Pesquisa (CONEP), e todos os pacientes incluídos assinaram o termo de consentimento informado na admissão nos respectivos EAPs (CA209-169 e CA209-168).

O presente estudo foi submetido ao CEP do A.C. Camargo Cancer Center e aprovado sob o n. 2465/17 (Anexo 1).

#### **4.7 FONTE FINANCIADORA**

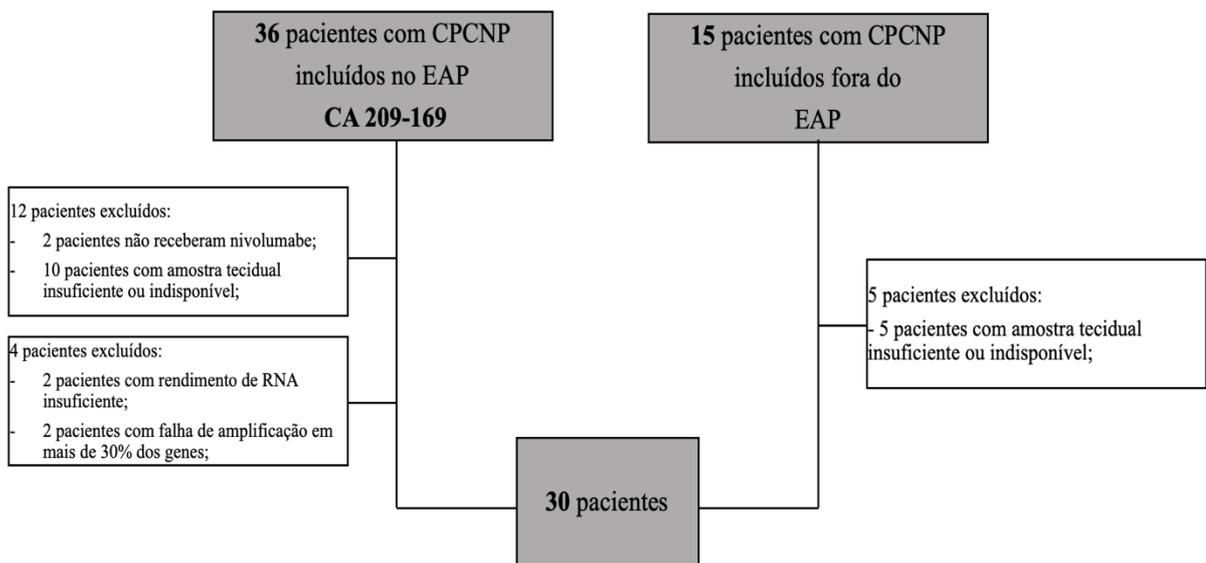
Os custos deste estudo (CA 209-950) foram financiados pela BMS (Bristol-Meyers-Squibb) mediante um acordo firmado com a instituição, dentro de um programa *IIS* (*Investigator Initiated Study*), e foi avaliado e aprovado pelo PAE e pelo centro de avaliação de viabilidade financeira.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS (CPCNP)

#### 5.1.1 Perfil dos Pacientes com CPCNP

Considerando os pacientes recrutados (36) para receber o tratamento com o nivolumabe entre novembro/2014 a janeiro/2016 dentro do EAP CA209-169 no A.C.Camargo Cancer Center, apenas 24 pacientes preencheram os critérios de elegibilidade e tiveram as amostras de tecidos tumorais FFPE encaminhados para a extração do RNA. Entre os pacientes com câncer de pulmão, dois não receberam o nivolumabe e dez não possuíam as amostras de tecidos parafinados armazenados nos arquivos do setor de patologia do A.C.Camargo Cancer Center e, portanto, 12 pacientes foram excluídos (Figura 6).



**Figura 6** - Fluxograma de inclusão e exclusão das amostras em CPCNP.

Entre as 24 amostras da coorte de câncer de pulmão que tiveram o RNA extraído, duas (CP4720 e CP8490) apresentaram rendimento insuficiente e, portanto, não puderam ser analisadas quanto à expressão gênica pelo TLDA (Apêndice 1). Além disso, outras duas amostras (CP2740 e CP7490) demonstraram falha na amplificação em mais de 30% dos genes pelo TLDA e também foram excluídas desta análise (Figura 6).

As amostras de 10 pacientes com CPCNP tratados com nivolumabe fora do EAP (CA 209-169) obtiveram rendimento adequado de RNA e a amplificação dos genes pelo TLDA ocorreu de maneira satisfatória, sendo adicionadas ao estudo (Figura 6).

Considerando os 30 pacientes que tiveram as suas amostras elegíveis para análise de expressão gênica na coorte de câncer de pulmão, a idade mediana ao início do ICI foi de 58,5 anos. Quinze pacientes (50%) eram do sexo masculino, 80% apresentavam bom performance status pré-nivolumabe (ECOG 0 e 1), 63,3% possuíam metástases ao diagnóstico e 76,6% eram tabagistas ou ex-tabagistas. O adenocarcinoma foi a histologia mais comum (80%) e a pesquisa de mutações *drivers* (mutação de *EGFR* ou rearranjo de *ALK*) foi realizada em todos os pacientes, sendo identificada em apenas 4 (deleção no éxon 19 do *EGFR*). O nivolumabe foi administrado na segunda ou terceira linha de tratamento em 73% dos casos (Tabela 3).

**Tabela 3** - Características demográfica e clínico-patológicas dos pacientes na coorte de câncer de pulmão (N=30)

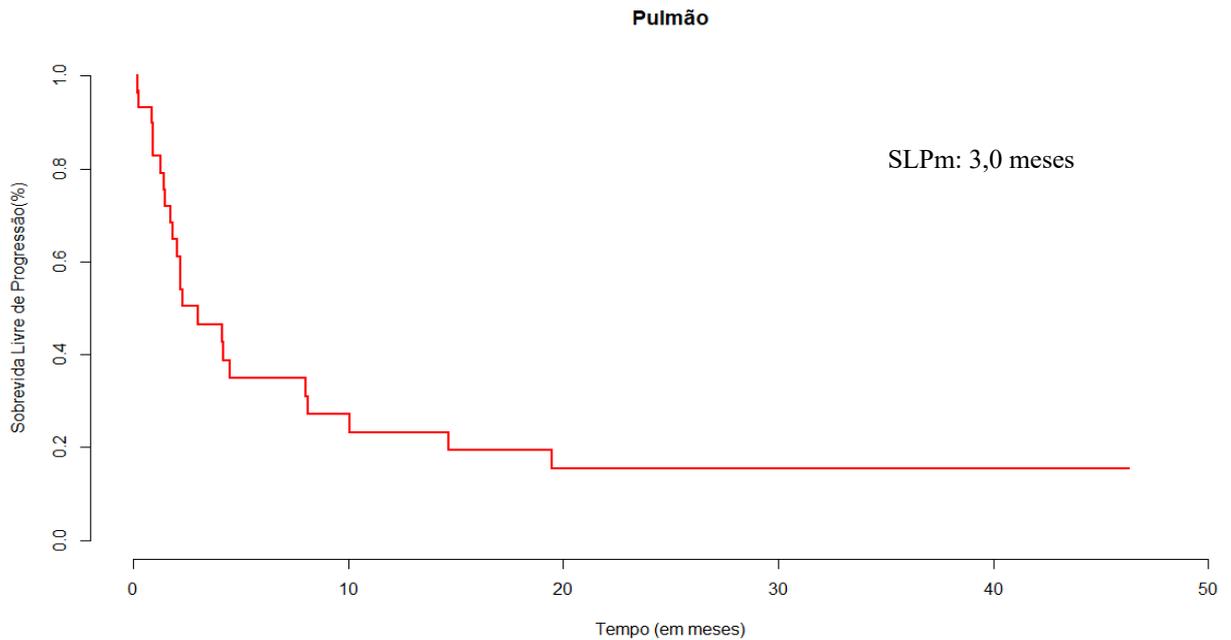
Variáveis	Respondedores N (%)	Não Respondedores N (%)	Total	p
<b>Idade (anos)</b>				
Mediana (DP)	59,0 (10,3)	55,0 (10,9)	56,0 (10,5)	0,44
<b>Sexo</b>				
Masculino	6 (54,5)	9 (47,4)	15 (50)	1,00
Feminino	5 (45,5)	10 (52,6)	15 (50)	
<b>Tabagismo</b>				
Tabagista	1 (9,1)	6 (31,5)	7 (23,3)	0,27
Ex-tabagista	8 (72,7)	8 (42,1)	16 (53,3)	
Não tabagista	2 (18,2)	4 (21,1)	6 (20)	
Desconhecido	0 (0)	1 (5,2)	1 (3,3)	
<b>Carga Tabágica (anos-maço)</b>				
Média (DP)	60,5 (72,9)	37,3 (26,9)	46,8 (52,4)	0,51
<b>Estadiamento ao diagnóstico</b>				
IB	2 (18,2)	0 (0)	2 (6,7)	0,07
IIA	0 (0)	1 (5,3)	1 (3,3)	
IIB	1 (9,1)	0 (0)	1 (3,3)	
IIIA	1 (9,1)	5 (26,3)	6 (20)	
IIIB	1 (9,1)	0 (0)	1 (3,3)	
IV	6 (54,6)	13 (68,4)	19 (63,3)	
<b>Histologia</b>				
Adenocarcinoma	6 (54,5)	18 (94,7)	24 (80)	0,003
Carcinoma de células escamosas	5 (45,5)	0 (0)	5 (16,7)	
Outros	0 (0)	1 (5,3)	1 (3,3)	
<b>Mutação <i>Driver</i> Conhecida</b>				
Sim	0 (0)	4 (21,1)	4† (13,3)	0,26
Não	11 (100)	15 (78,9)	26 (86,7)	
<b>Amostra Tecidual</b>				
Biópsia	5 (45,5)	9 (47,4)	14 (46,7)	0,29
Ressecção Cirúrgica	6 (54,5)	10 (52,6)	16 (53,3)	
<b>ECOG*</b>				
0	1 (9,1)	1 (5,3)	2 (6,7)	0,68
1	8 (72,7)	14 (73,7)	22 (73,3)	
2	2 (18,2)	2 (10,5)	4 (13,3)	
3	0 (0)	2 (10,5)	2 (6,7)	
4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<b>Linha de Nivolumabe</b>				
1	2 (18,2)	0 (0)	2 (6,7)	0,15
2	3 (27,3)	7 (36,8)	10 (33,3)	
3	5 (45,5)	7 (36,8)	12 (40)	
Outras	1 (9,1)	5 (26,3)	6 (20)	

\* ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group performance score*) (pré-nivolumabe).

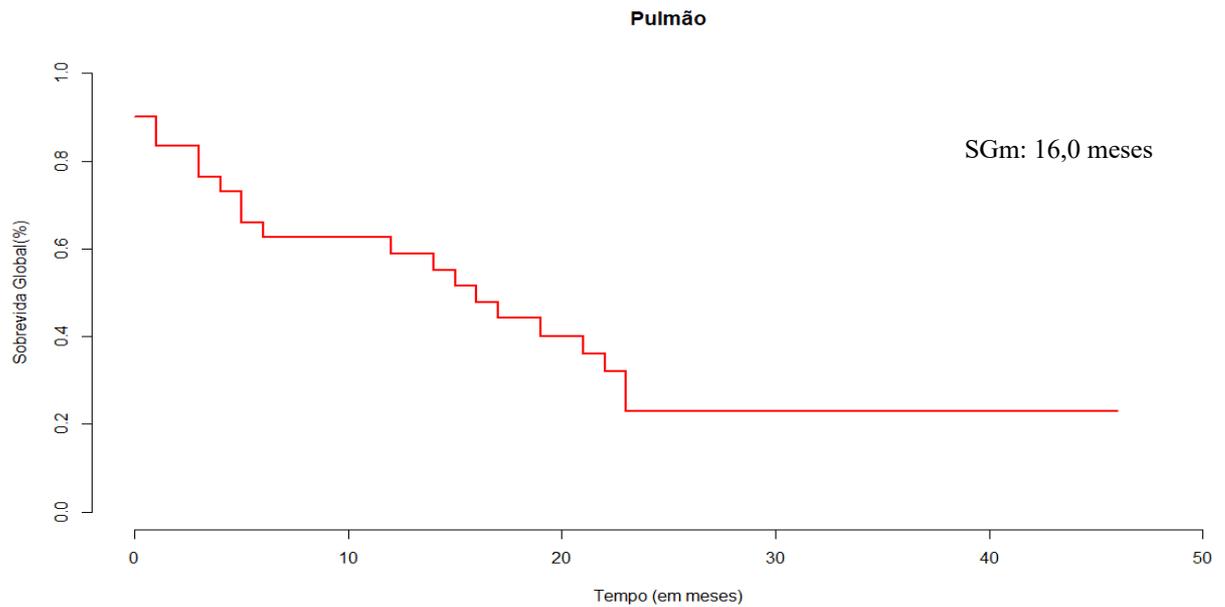
† Deleção éxon 19 do gene *EGFR*.

### 5.1.2 Desfechos Clínicos com o Nivolumabe em CPCNP

O tempo de seguimento mediano (TSm) dos pacientes na coorte de câncer de pulmão foi de 43 meses. A SLP mediana do tratamento com nivolumabe foi de 3,0 meses (IC95%, 1,14-4,85) (Figura 7). A SG mediana foi de 16 meses (IC95%, 10,9-21,01) (Figura 8). As taxas de SG em 12 meses e 24 meses foram de 58,8% e 23%, respectivamente.



**Figura 7** - Sobrevida livre de progressão na coorte de câncer de pulmão (N=30) tratada com nivolumabe. O gráfico mostra a curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de progressão, que foi definida como o tempo da primeira dose de nivolumabe até a data da progressão da doença, morte ou última avaliação do tumor.



**Figura 8** - Sobrevida global na coorte de câncer de pulmão (N=30). O gráfico mostra a curva de Kaplan-Meier para sobrevida global, que foi definida como o tempo da primeira dose de nivolumabe até a data da morte por qualquer causa ou última avaliação do tumor.

Na coorte de CPCNP tratados com o nivolumabe, cerca de 36,7% dos pacientes beneficiaram-se da terapia e foram considerados como respondedores, ao passo que 63,3% não responderam ao tratamento (Tabela 4). A TRO (RC + RP) foi de 20% e a maioria dos pacientes apresentou PD como resposta.

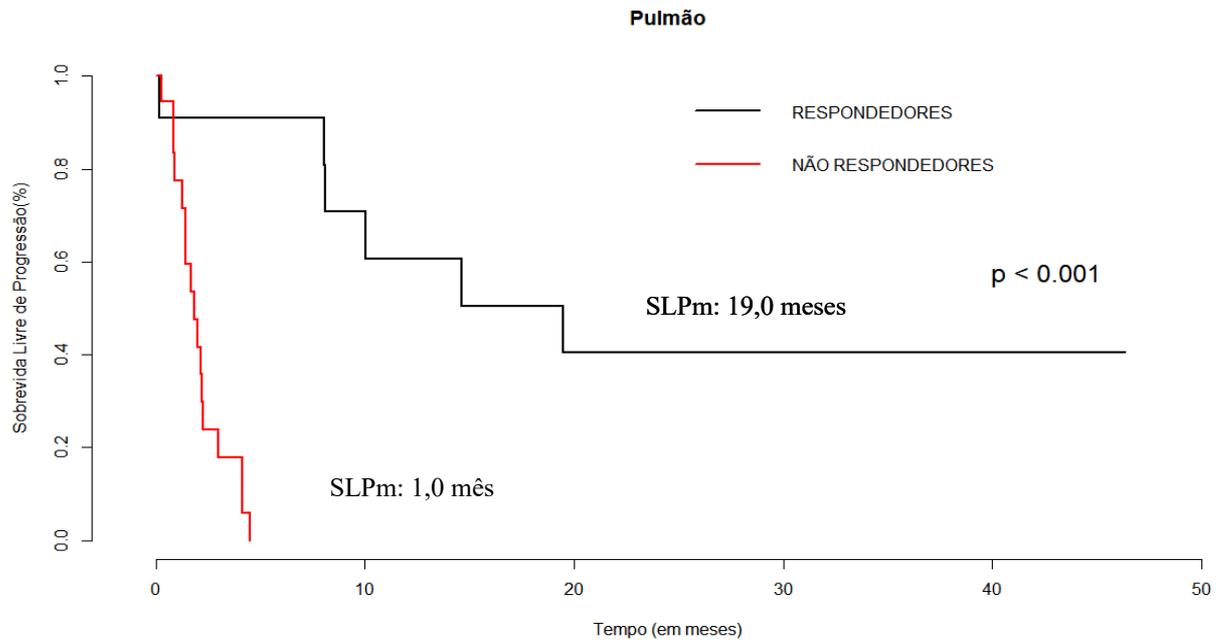
**Tabela 4** - Desfechos de sobrevida e resposta tumoral com o nivolumabe em pacientes com câncer de pulmão (N=30)

Desfechos Clínicos	N (%)
<b>Sobrevida Global (meses)</b>	
Mediana	16,0
IC95%	10,99-21,01
<b>Sobrevida Livre de Progressão (meses)</b>	
Mediana	3,0
IC95%	1,14-4,85
<b>Taxa de Resposta</b>	
<b>Respondedores*</b>	<b>11 (36,7)</b>
Resposta Completa	3 (10)
Resposta Parcial	3 (10)
Doença Estável $\geq$ 6 meses	5 (16,6)
<b>Não Respondedores*</b>	<b>19 (63,3)</b>
Doença Estável <6 meses	1 (3,3)
Progressão de Doença	18 (60)

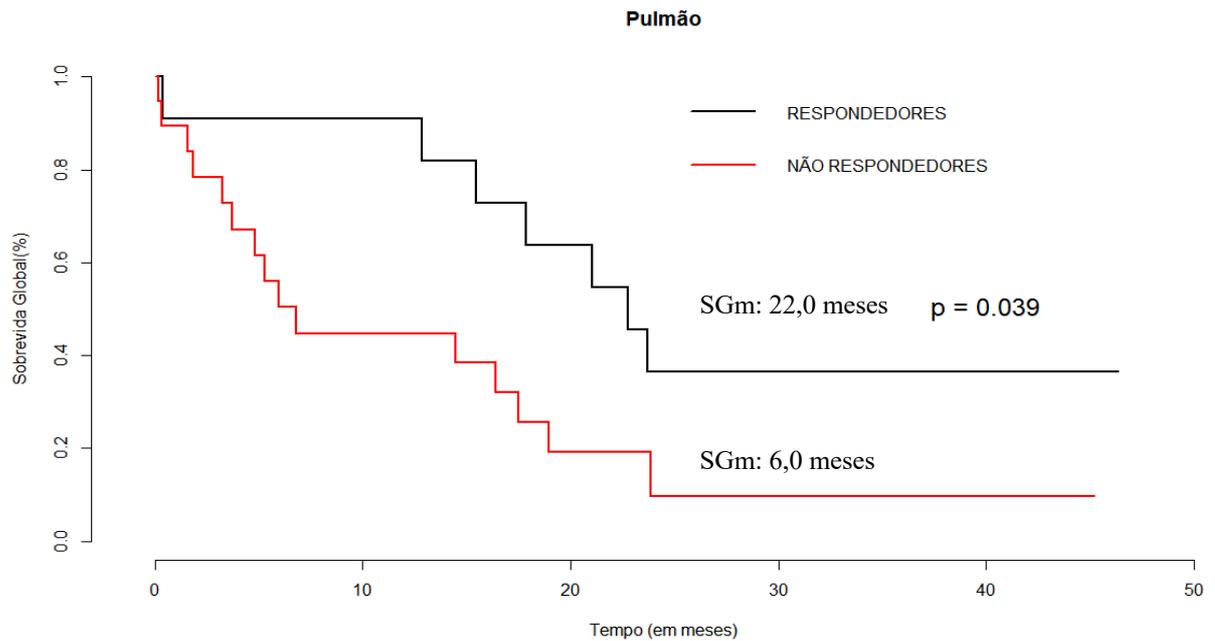
\*Respondedores – Resposta Completa + Resposta Parcial + Doença Estável  $\geq$  6 meses

\*Não Respondedores – Doença Estável < 6 meses + Progressão de Doença

Os pacientes respondedores ao anti-PD-1 tiveram uma SLP mediana consideravelmente superior a dos não respondedores (SLPm: 19 meses x 1,0 mês,  $p < 0,001$ ) (Figura 9). O mesmo benefício foi observado em relação à SG (SGm: 22 meses x 6,0 meses,  $p = 0,039$ ) (Figura 10)



**Figura 9** - Sobrevida livre de progressão nos respondedores e não respondedores ao nivolumabe na coorte de câncer de pulmão (N=30). O gráfico mostra a curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de progressão, que foi definida como o tempo da primeira dose de nivolumabe até a data da progressão da doença, morte ou última avaliação do tumor.

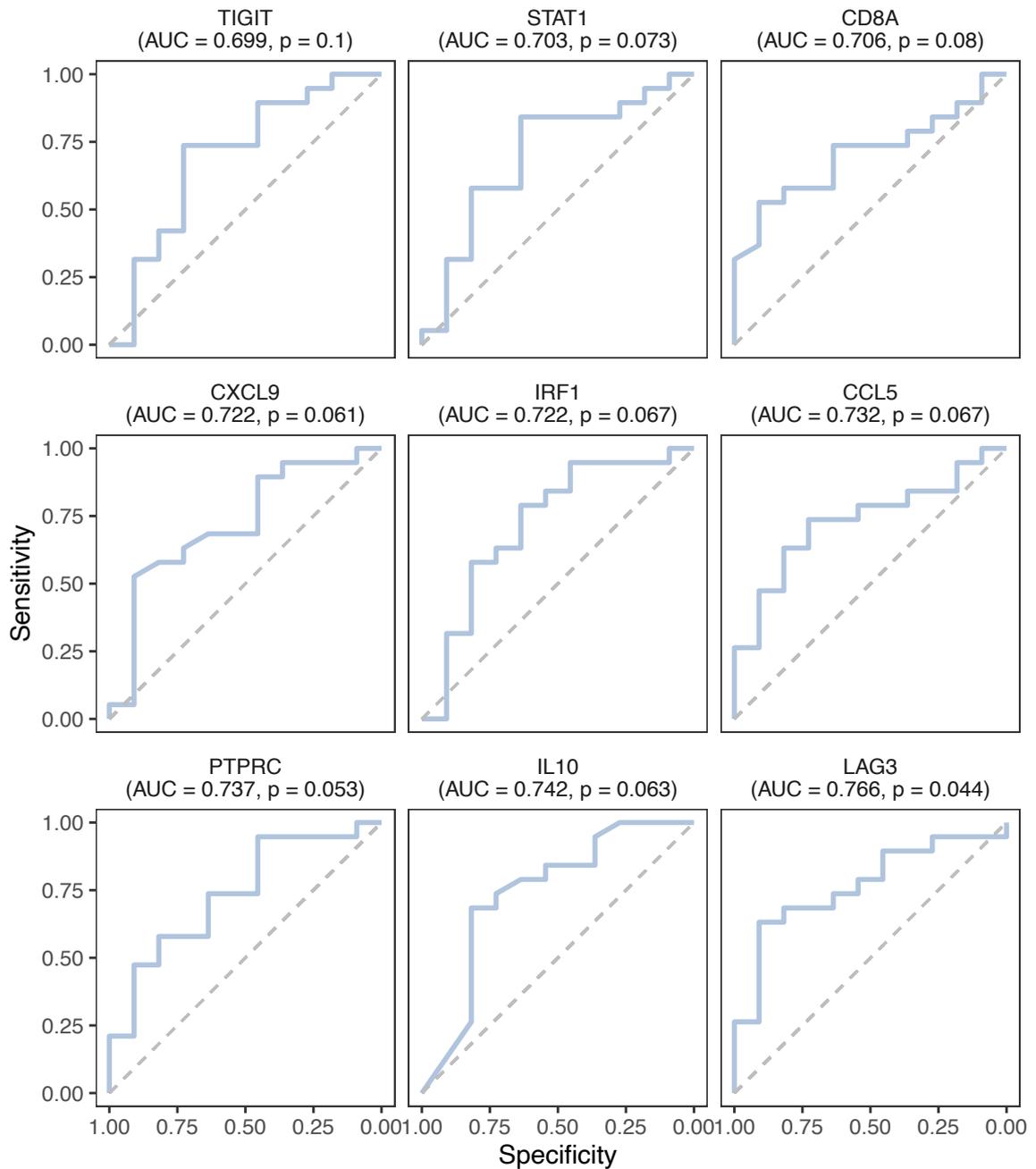


**Figura 10** - Sobrevida global nos respondedores e não respondedores ao nivolumabe na coorte de câncer de pulmão (N=30). O gráfico mostra a curva de Kaplan-Meier para sobrevida global, que foi definida como o tempo da primeira dose de nivolumabe até a data da morte por qualquer causa ou última avaliação do tumor.

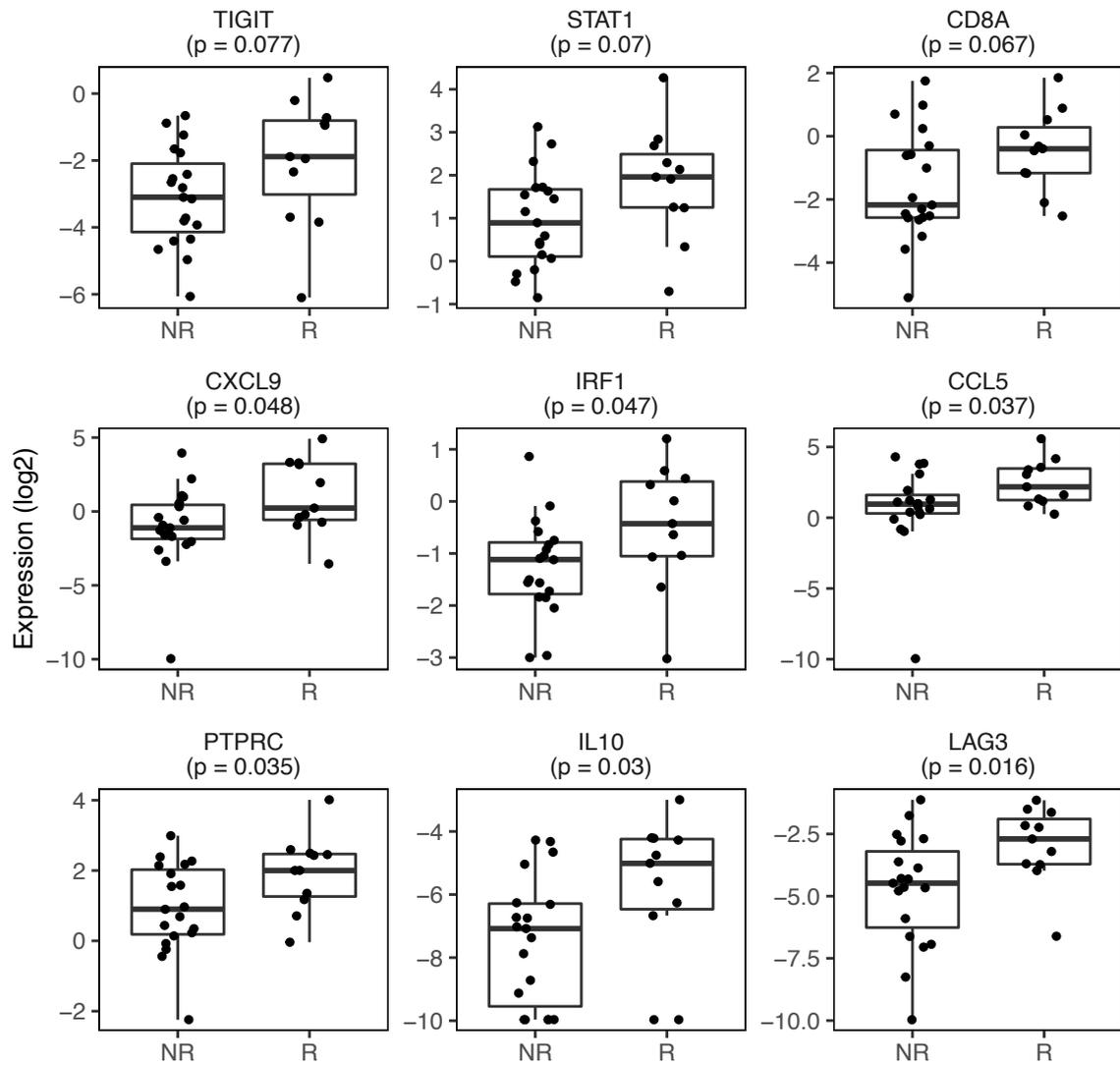
### 5.1.3 Associação da Expressão Gênica com os Desfechos Clínicos em CPCNP

Na coorte de câncer de pulmão, 30 amostras foram incluídas para a análise do perfil de expressão gênica. Considerando-se os 41 genes avaliados, a expressão de *TIGIT*, *STAT1*, *CD8A*, *CXCL9*, *IRF1*, *CCL5*, *PTPRC*, *IL10* e *LAG3* apresentou associação com a resposta ao nivolumabe nos pacientes com CPCNP ( $p < 0,1$  no teste de Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) (Apêndice 1). Nas curvas ROC, estes genes demonstraram a capacidade de predição de resposta ao imunoterápico, com AUC acima de 0,69 (Figura 11), e a expressão gênica foi maior nos respondedores em relação aos não respondedores ( $p < 0,1$ ) (Figura 12). Além disso, foi possível identificar uma coexpressão destes genes nas amostras de pacientes com câncer de pulmão que obtiveram o benefício clínico com o nivolumabe (Figura 13).

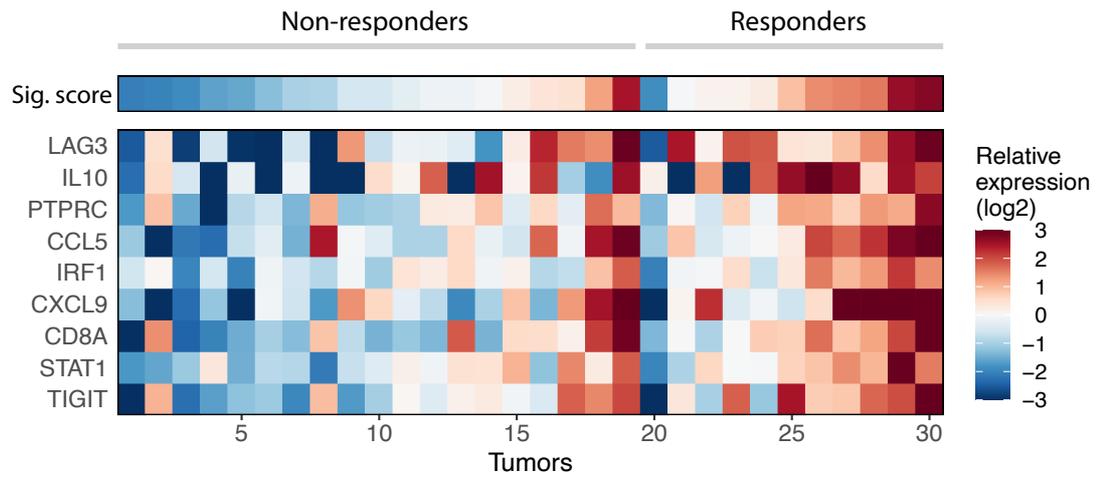
Entre os genes que foram capazes de prever a resposta ao nivolumabe nos pacientes com CPCNP, a mediana da expressão de cada gene foi utilizada como ponto de corte e empregada na análise de sobrevida. Os pacientes com uma alta expressão dos genes *CXCL9* e *LAG3* apresentaram uma SLP maior ( $p < 0,05$ ) que os indivíduos com baixa expressão (Figura 14). Já a alta expressão dos genes *TIGIT*, *IL10*, *CD8A*, *CCL5* e *LAG3* associou-se com prolongamento na SG ( $p < 0,05$ ) (Figura 15).



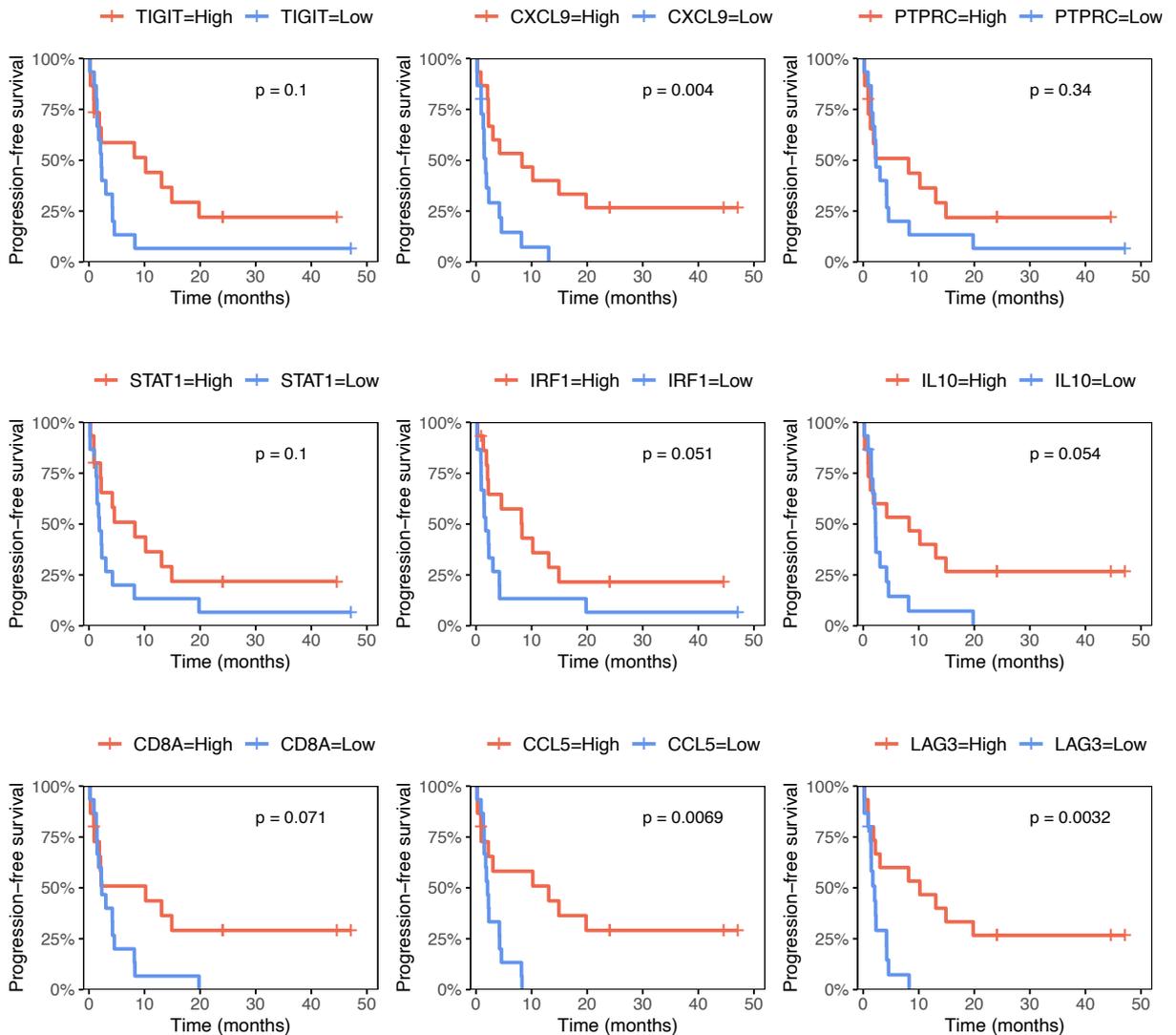
**Figura 11** - Curvas ROC demonstrando o poder de predição de resposta da expressão de genes selecionados ( $p < 0,1$  no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) na coorte de CPCNP (N=30). Os valores de p mostrados referem-se à regressão logística.



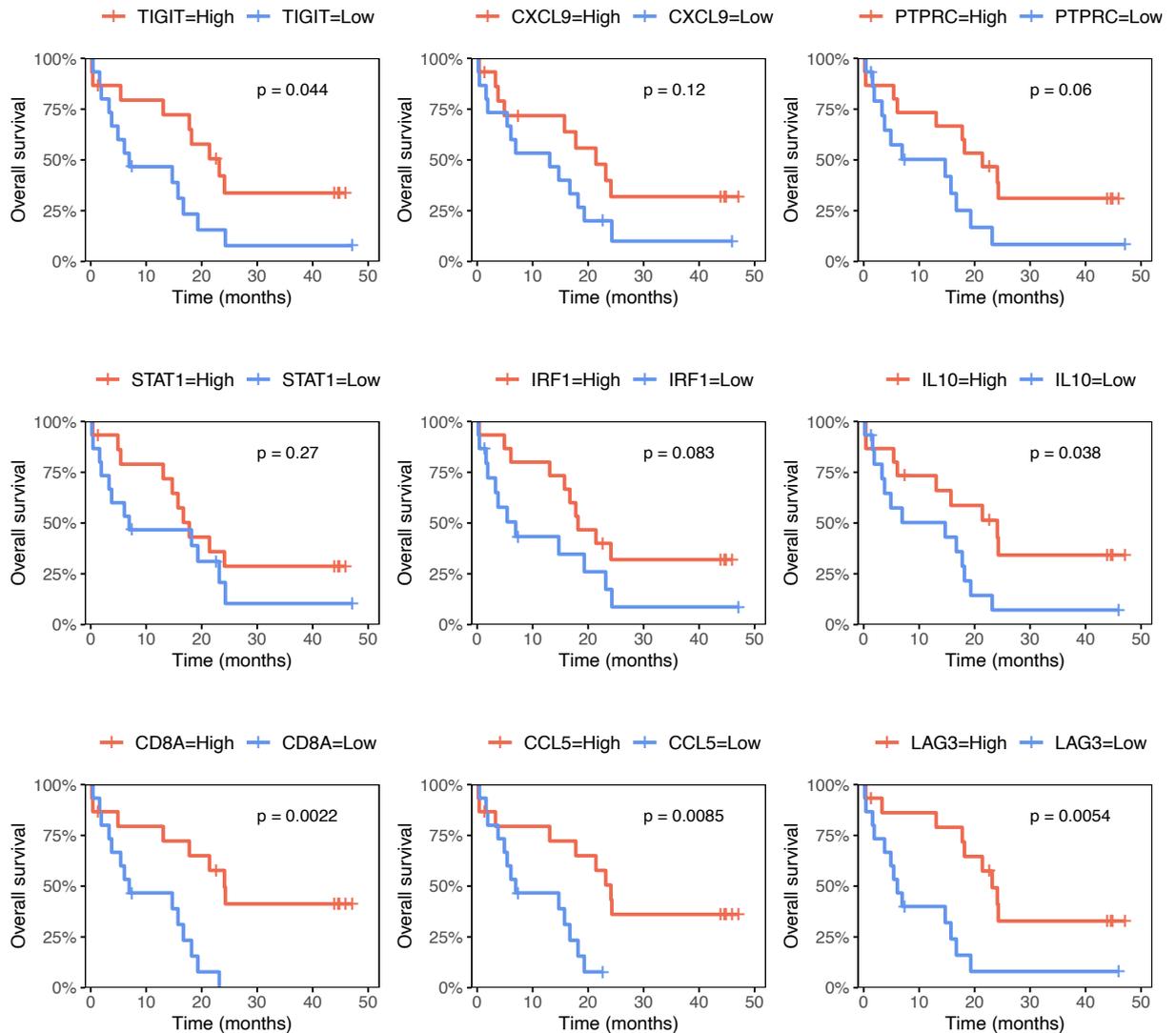
**Figura 12** - *Boxplots* comparando a expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$  no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) em respondedores e não-respondedores aonivolumabe na coorte de CPCNP. Valores de  $p$  foram calculados com o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney bicaudal ( $N=30$ ).



**Figura 13** - *Heatmap* mostrando a expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$  no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) na coorte de CPCNP (N=30). Os valores de expressão de cada gene foram centralizados subtraindo-se as respectivas médias de expressão. O valor da assinatura gênica mostrada no topo representa a média dos valores centralizados de expressão dos genes no *heatmap*. Os pacientes foram ordenados, em cada grupo, com base no valor da assinatura gênica. Observa-se uma clara maior expressão desse conjunto de genes entre as amostras provenientes de respondedores.



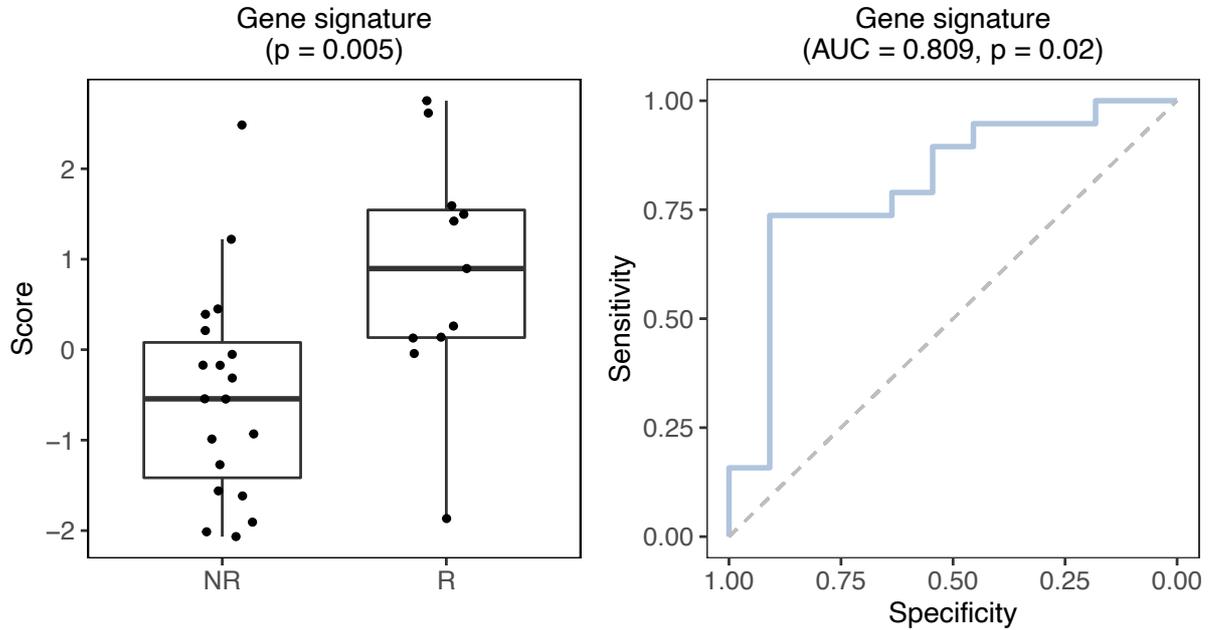
**Figura 14** - Curvas de Kaplan-Meier comparando a SLP em pacientes com alta vs. baixa expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$  no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) na coorte de CPCNP (N=30). A mediana da expressão foi utilizada como corte para dicotomização dos pacientes. Valores de  $p$  foram calculados com o teste de log-rank.



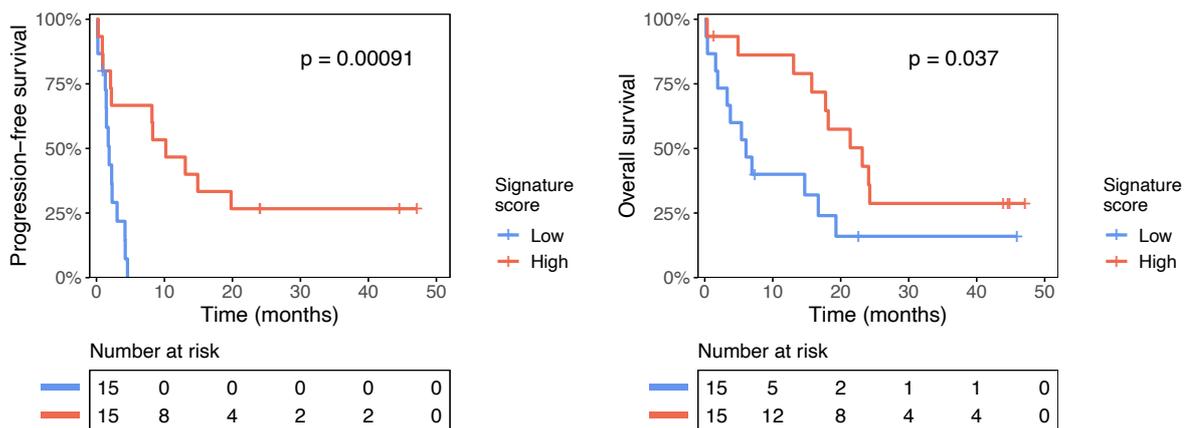
**Figura 15** - Curvas de Kaplan-Meier comparando a SG em pacientes com alta vs. baixa expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$  no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) na coorte de CPCNP ( $N=30$ ). A mediana da expressão foi utilizada como corte para a dicotomização dos pacientes. Valores de  $p$  foram calculados com o teste de log-rank.

Posteriormente, os genes *TIGIT*, *STAT1*, *CD8A*, *CXCL9*, *IRF1*, *CCL5*, *PTPRC*, *IL10* e *LAG3* foram combinados para gerar uma assinatura gênica cujo valor representa a média dos níveis de expressão destes genes. O valor da assinatura gênica foi capaz de prever a resposta à imunoterapia com uma AUC de 0,80 ( $p=0,02$ ) e nos pacientes respondedores este valor foi significativamente superior que nos não respondedores ( $p=0,005$ ) (Figura 16). Nesta coorte, os pacientes com um alto valor da assinatura gênica apresentaram uma SG (HR 0,30;  $p=0,037$ ) e SLP (HR 0,11;  $p=0,0009$ ) significativamente maiores que os indivíduos com um baixo valor (Figura 17). A assinatura gênica mostrou-se um fator

prognóstico de SG e SLP independente do histórico de tabagismo do paciente, ECOG e número de metástases (Tabela 5).



**Figura 16** – (1) *Boxplot* comparando o valor da assinatura gênica em respondedores e não-respondedores ao nivolumabe em CPCNP (N=30). Valor de p foi calculado com o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney bicaudal. (2) Curva ROC demonstrando o poder de predição de resposta da assinatura gênica. O valor da assinatura gênica representa a média dos valores centralizados de expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$  com teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística).



**Figura 17** - Curvas de Kaplan-Meier comparando SLP (1) e SG (2) em pacientes da coorte de CPCNP (N=30) com alto vs. baixo valor da assinatura gênica. A mediana da expressão foi utilizada como ponto de corte para a dicotomização dos pacientes. Os valores de p foram calculados com o teste de log-rank. O valor da assinatura gênica representa a média dos valores centralizados de expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$  no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística).

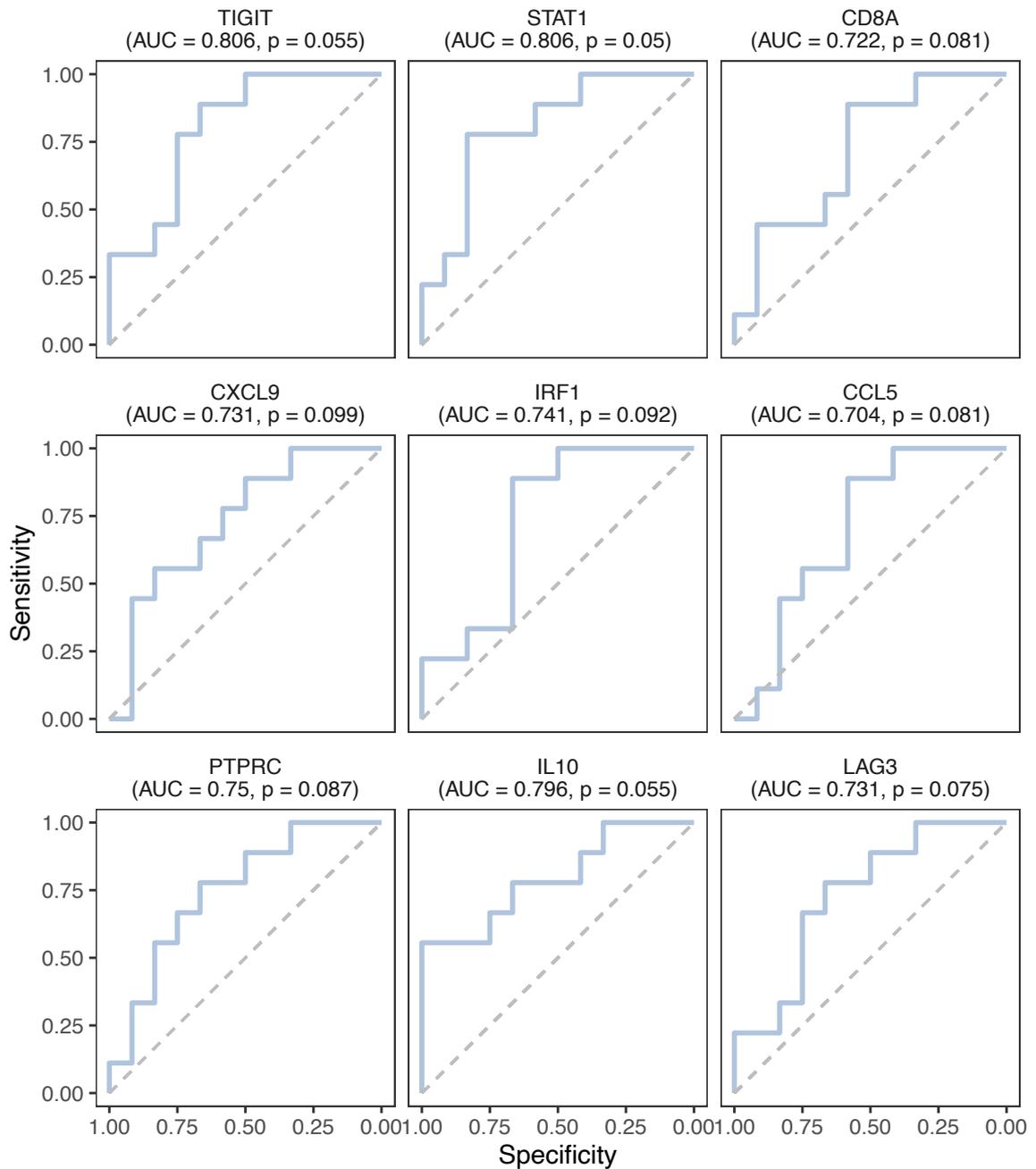
**Tabela 5** – Análise multivariada da coorte de CPCNP (N=30) comparando a SG de pacientes com alto vs. baixo valor da assinatura gênica por regressão de Cox ajustada para tabagismo, ECOG pré-nivolumabe e número de metástases pré-nivolumabe

Variáveis	HR	IC95%	p-valor
Histórico de tabagismo (sim vs não)	0.58	0,21-1,61	0.58
ECOG (outros vs 0-1)	2.56	0,84-7,76	0.09
Número de metástases (3-4 vs 1-2)	0.79	0,30-2,05	0.63
Valor da assinatura (alto vs baixo)	0.35	0,14-0,90	0.03

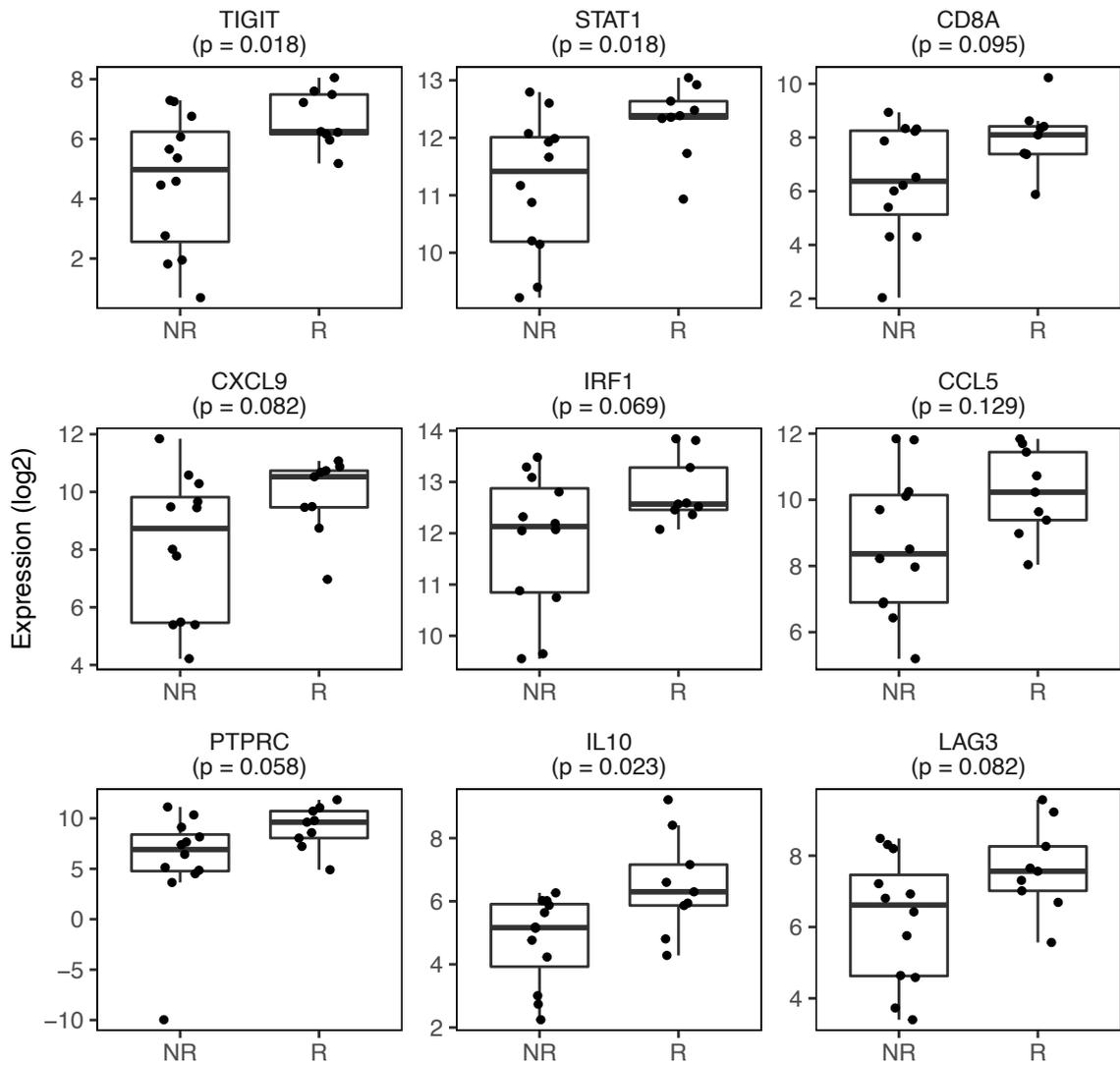
#### 5.1.4 Validação dos Genes e Assinaturas Gênicas em CPCNP

Com o intuito de verificar se os genes selecionados e as assinaturas genéticas identificadas são, de fato, potenciais biomarcadores de resposta à imunoterapia, realizamos uma validação externa com múltiplos *datasets* disponíveis no repositório *Gene Expression Omnibus* (GEO) GSE136961 para a coorte de CPCNP.

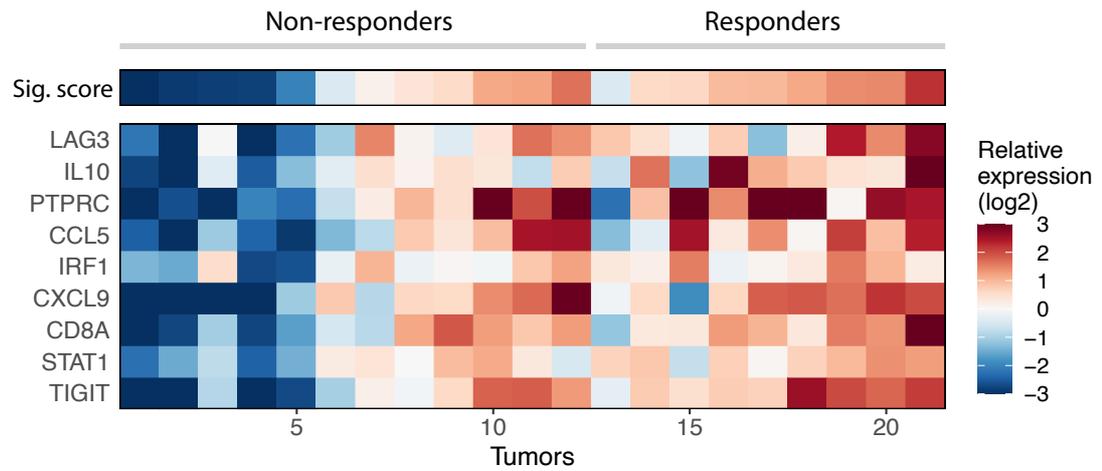
No grupo de câncer de pulmão, os genes *TIGIT*, *STAT1*, *CD8A*, *CXCL9*, *IRF1*, *CCL5*, *PTPRC*, *IL10* e *LAG3* demonstraram o poder de predição de resposta ao nivolumabe com  $AUC > 0,7$  (Figura 18). Além disso, nesta análise, a expressão destes genes foi maior ( $p < 0,1$ ) nos respondedores, exceto o *CCL5* que apresentou apenas uma tendência estatística de superioridade (Figura 19). Analisando conjuntamente os genes validados, ficou nítido um agrupamento daqueles com os maiores níveis de expressão nas amostras de pacientes que responderam ao anti-PD-1 (Figura 20). Já a relação entre os níveis de expressão gênica e os desfechos de sobrevida com o nivolumabe, a alta expressão do *TIGIT* correlacionou-se com uma maior SLP, ao passo que nenhum dos genes influenciou os resultados de SG (Figuras 21 e 22).



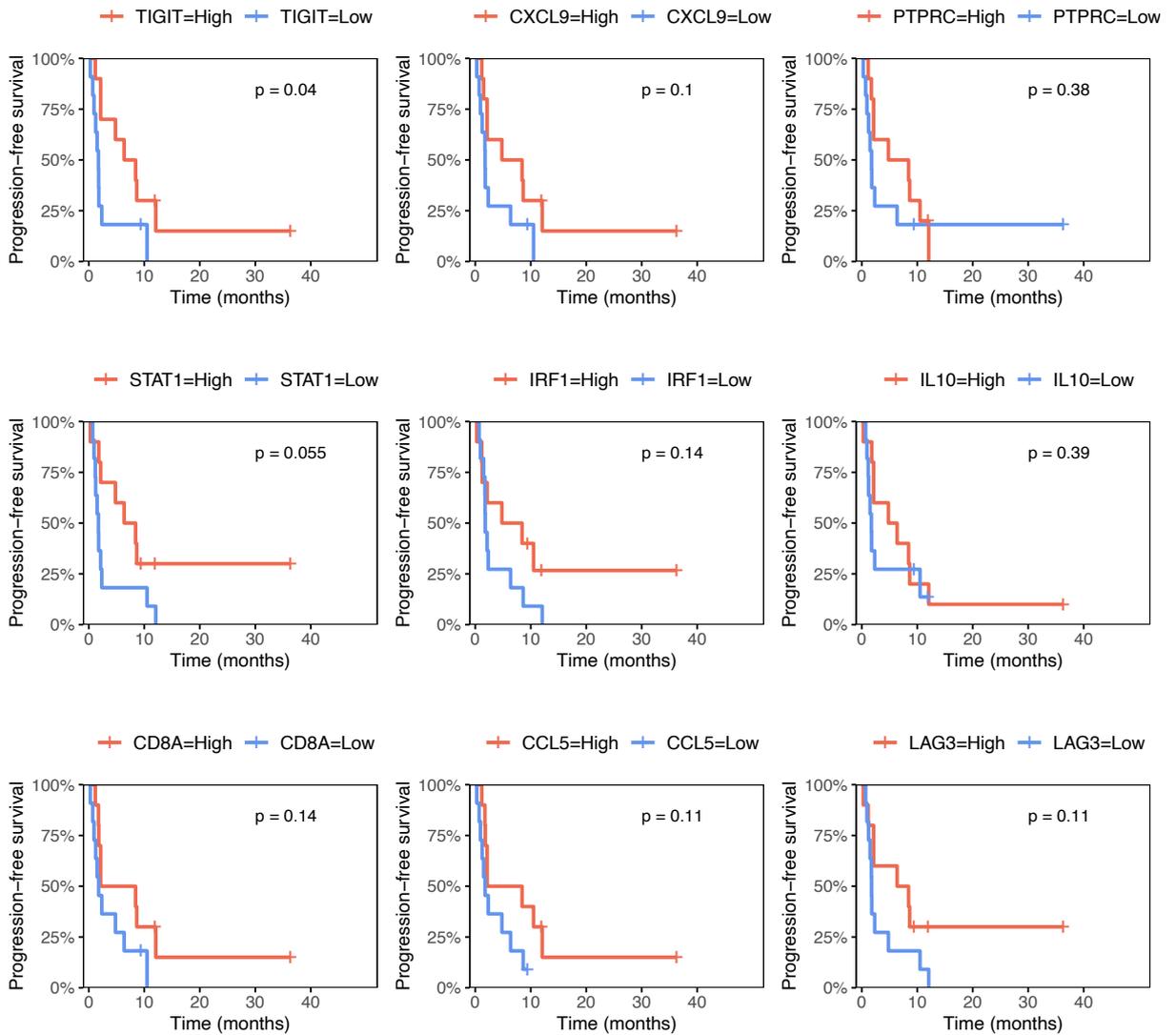
**Figura 18** - Curvas ROC demonstrando o poder de predição de resposta da expressão de genes selecionados na coorte de CPCNP (N=21) do banco de dados do GEO GSE136961.



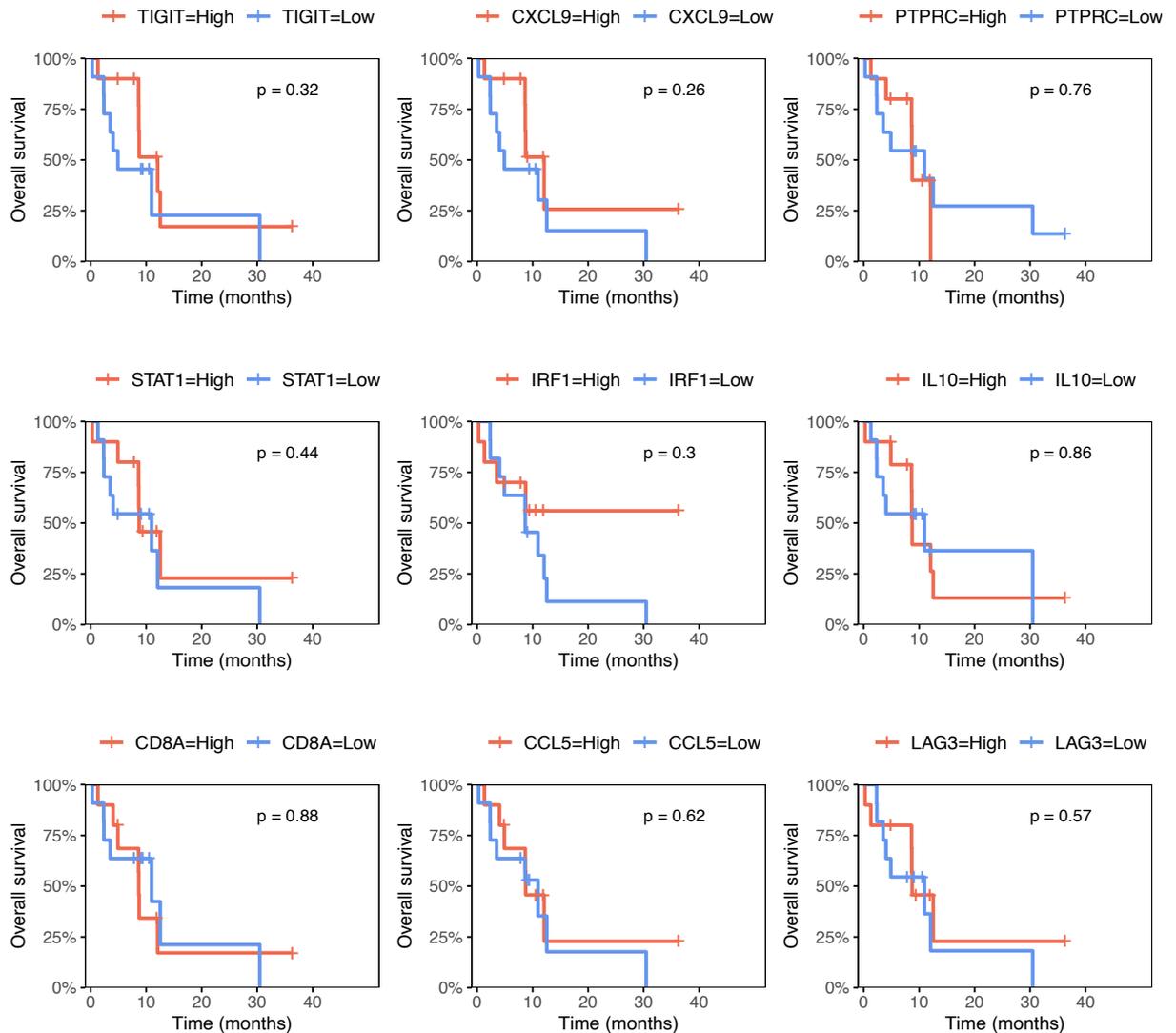
**Figura 19** - *Boxplots* comparando a expressão dos genes selecionados em respondedores e não-respondedores ao nivolumabe na coorte de CPCNP (N=21) do banco de dados do GEO GSE136961. Valores de p foram calculados com o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney bicaudal.



**Figura 20** - *Heatmap* mostrando a expressão dos genes validados em uma coorte de CPCNP (N=21) do banco de dados do GEO GSE136961. Os valores de expressão de cada gene foram centralizados subtraindo-se as respectivas médias de expressão. O valor da assinatura gênica mostrada no topo representa a média dos valores centralizados de expressão dos genes no *heatmap*. Os pacientes foram ordenados, em cada grupo, com base no valor da assinatura gênica. Observa-se uma maior expressão desse conjunto de genes entre as amostras provenientes de respondedores.

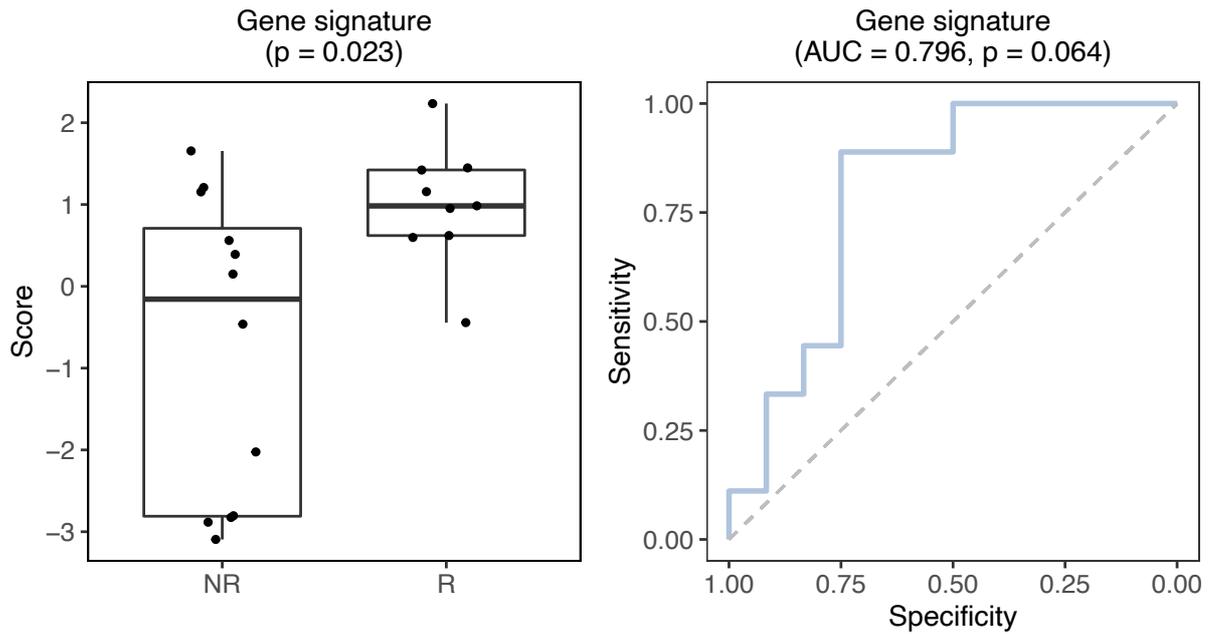


**Figura 21** - Curvas de Kaplan-Meier comparando a SLP em pacientes com alta vs. baixa expressão dos genes validados na coorte de CPCNP (N=21) do banco de dados do GEO GSE136961. A mediana da expressão foi utilizada como corte para a dicotomização dos pacientes. Valores de p foram calculados com o teste de log-rank.

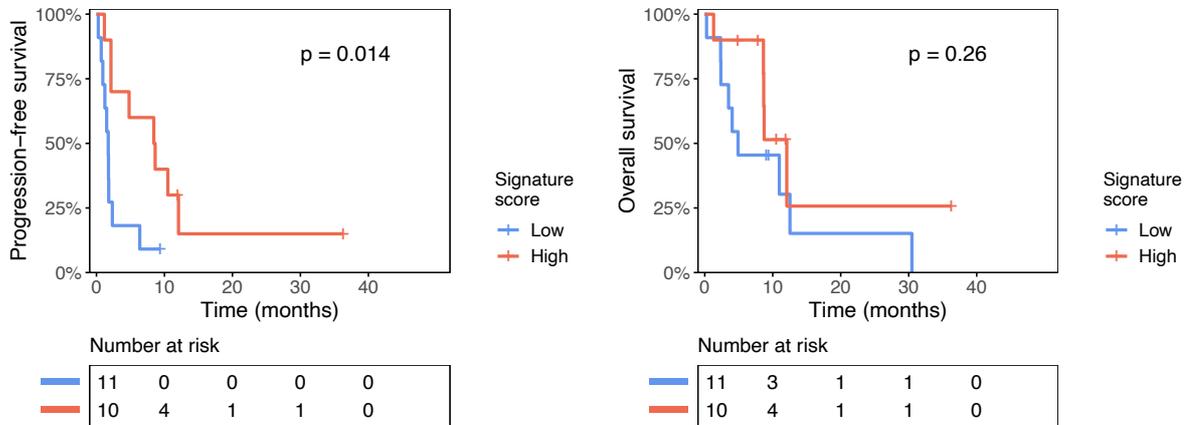


**Figura 22** - Curvas de Kaplan-Meier comparando a SG em pacientes com alta vs. baixa expressão dos genes validados na coorte de CPCNP (N=21) do banco de dados do GEO GSE136961. A mediana da expressão foi utilizada como corte para a dicotomização dos pacientes. Valores de p foram calculados com o teste de log-rank.

A assinatura gerada a partir da combinação dos genes validados *TIGIT*, *STAT1*, *CD8A*, *CXCL9*, *IRF1*, *CCL5*, *PTPRC*, *IL10* e *LAG3* também foi examinada na coorte externa de CPCNP. Nesta etapa de validação, o valor da assinatura genética dos respondedores também superou o dos não respondedores ( $p=0,023$ ), assim como comprovou a habilidade de prever o benefício clínico dos ICIs no tratamento do câncer de pulmão (Figura 23). Vale ressaltar que a magnitude do valor da assinatura impactou na SLP, mas não na SG (Figura 24).



**Figura 23** – (1) *Boxplot* comparando o valor da assinatura gênica em respondedores e não-respondedores ao nivolumabe na coorte de CPCNP (N=21) do banco de dados do GEO GSE136961. Valor de p foi calculado com o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney bicaudal. (2) Curva ROC demonstrando o poder de predição de resposta da assinatura gênica validada no banco de dados do GEO GSE136961. O valor da assinatura gênica representa a média dos valores centralizados de expressão dos genes.



**Figura 24** - Curvas de Kaplan-Meier comparando a SLP (1) e a SG (2) em pacientes com alto vs. baixo valor da assinatura gênica na coorte de CPCNP (N=21) do banco de dados do GEO GSE136961. A mediana da expressão foi utilizada como ponto de corte para a dicotomização dos pacientes. Os valores de p foram calculados com o teste de log-rank. O valor da assinatura gênica representa a média dos valores centralizados de expressão dos genes.

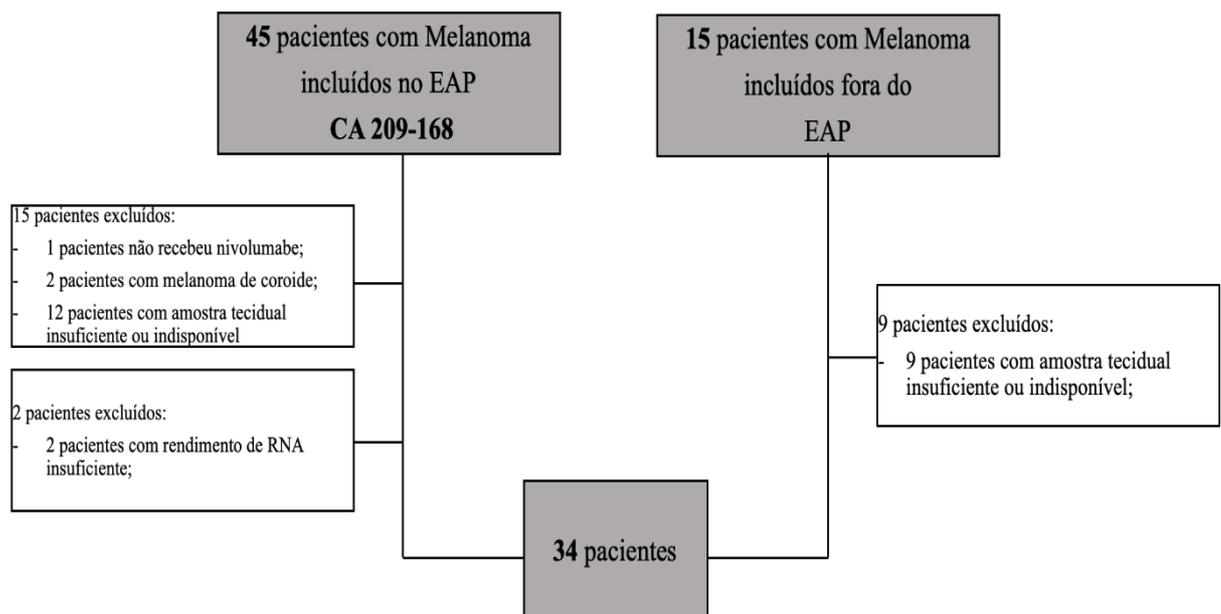
## 5.2 MELANOMA

### 5.2.1 Perfil dos Pacientes com Melanoma

Considerando os 45 pacientes recrutados para receber o nivolumabe entre novembro/2014 a janeiro/2016 dentro do EAP CA209-168 no A.C.Camargo Cancer Center, apenas 30 preencheram os critérios de elegibilidade e tiveram as amostras de tecidos tumorais FFPE encaminhados para a extração do RNA. Na coorte de melanoma, um paciente não recebeu o nivolumabe, dois possuíam o diagnóstico de melanoma de coróide e doze não tinham os blocos de parafina disponíveis para a análise e, dessa forma, foram excluídos 15 pacientes (Figura 25).

Na coorte de melanoma, 30 amostras foram submetidas à extração de RNA e duas (MEL4310 e MEL7140) não alcançaram o rendimento necessário para a análise de expressão gênica através da plataforma TLDA (Apêndice 1).

Posteriormente, nós incluímos mais 6 amostras de pacientes com o diagnóstico de melanoma tratados com o nivolumabe fora do EAP (CA209-168). Todas as amostras apresentaram o rendimento de RNA e a amplificação dos genes no TLDA suficientes para a análise. No total, 34 amostras foram incluídas na coorte de melanoma (Figura 25).



**Figura 25** - Fluxograma de inclusão e exclusão das amostras em melanoma.

A idade mediana dos pacientes no início da imunoterapia com anti-PD-1 foi de 60 anos. Nesta coorte, houve um discreto predomínio do sexo masculino (58,8%), 70% eram

brancos, 73,5% foram diagnosticados com a doença em estágio inicial ou localmente avançado e 97% apresentavam boa performance status (ECOG 0 e 1). O nivolumabe foi administrado na segunda ou terceira linha em 64% dos casos (Tabela 6).

**Tabela 6** - Características demográficas e clínico-patológicas dos pacientes na coorte de melanoma (N=34).

Variáveis	Respondedores N (%)	Não Respondedores N (%)	Total	p
<b>Idade (anos)</b>				
Mediana (DP)	56,0 (17,3)	57,0 (11,9)	56,5 (14,5)	0,35
<b>Gênero</b>				
Masculino	7 (46,7)	13 (68,4)	20 (58,8)	0,35
Feminino	8 (53,3)	6 (31,6)	14 (41,2)	
<b>Raça</b>				
Branco	14 (93,3)	10 (52,6)	24 (70,6)	0,20
Preto	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Outros	0 (0)	2 (10,5)	2 (5,9)	
Desconhecido	1 (6,7)	7 (36,9)	8 (23,5)	
<b>Estadiamento clínico no diagnóstico</b>				
IA	2 (14,3)	1 (5,6)	3 (8,8)	0,51
IB	3 (21,4)	1 (5,6)	4 (11,8)	
IIA	0 (0)	1 (5,6)	1 (2,9)	
IIB	2 (14,3)	0 (0)	2 (5,9)	
IIC	1 (7,1)	1 (5,6)	2 (5,9)	
IIIA	2 (14,3)	3 (16,7)	5 (14,7)	
IIIB	0 (0)	2 (11,1)	2 (5,9)	
IIIC	1 (7,1)	3 (16,7)	4 (11,8)	
IV	3 (21,4)	6 (33,3)	9 (26,5)	
<b>Histologia</b>				
Extensivo Superficial	3 (20)	4 (21)	7 (20,6)	1,00
Nodular	2 (13,3)	3 (15,8)	5 (14,7)	
Acral	2 (13,3)	4 (21)	6 (17,6)	
Mucosa	0 (0)	1 (5,3)	1 (2,9)	
Desconhecido	8 (53,4)	7 (36,9)	15 (44,1)	
<b>Ulceração</b>				
Sim	2 (13,3)	6 (31,5)	8 (23,5)	0,66
Não	8 (53,3)	11 (57,9)	19 (55,9)	
Desconhecido	5 (33,4)	2 (10,6)	7 (20,6)	
<b>Mutação <i>BRAF</i></b>				
Sim	6 (40)	6 (31,5)	12 (35,3)	0,97
Não	9 (60)	12 (63,2)	21 (61,8)	
Desconhecido	0 (0)	1 (5,3)	1 (2,9)	

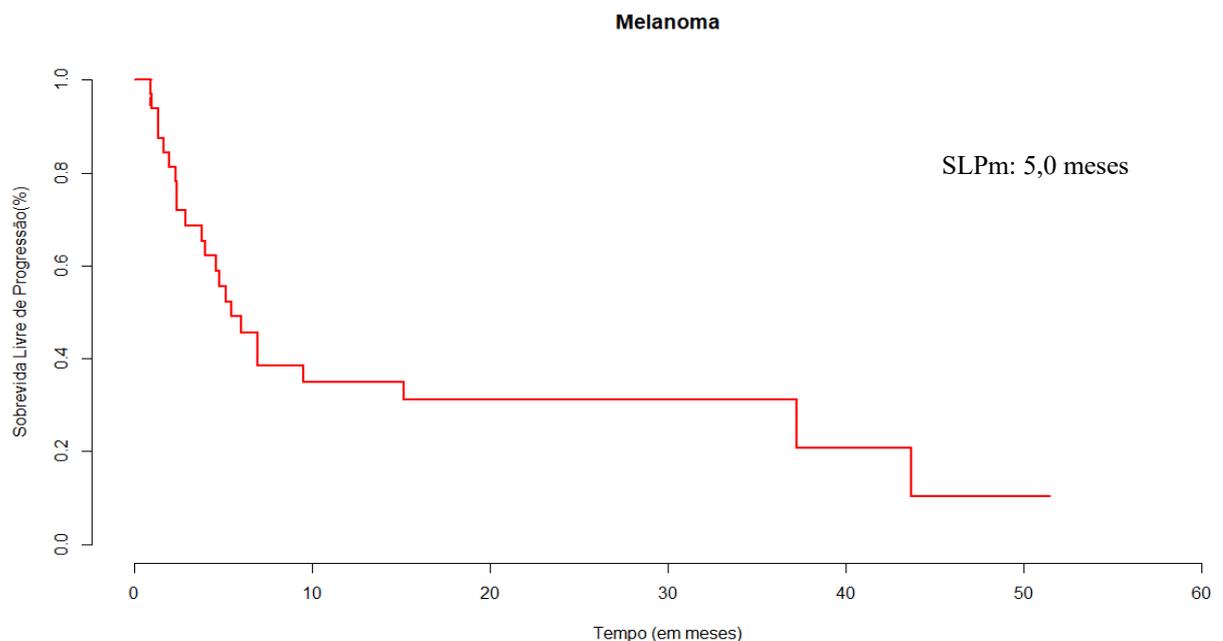
Cont/ Tabela 6

Variáveis	Respondedores N (%)	Não Respondedores N (%)	Total	p
<b>Amostra Tecidual</b>				
Biópsia	2 (13,3)	4 (21,1)	6 (17,6)	0,303
Ressecção Cirúrgica	13 (86,7)	15 (78,9)	28 (82,4)	
<b>ECOG*</b>				
0	5 (33,3)	4 (21,1)	9 (26,5)	0,44
1	9 (60)	15 (78,9)	24 (70,6)	
2	1 (6,7)	0 (0)	1 (2,9)	
3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<b>Linha de Nivolumabe</b>				
1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,54
2	4 (26,7)	7 (36,8)	11 (32,4)	
3	4 (26,7)	7 (36,8)	11 (32,4)	
4	3 (20)	4 (21,1)	7 (20,6)	
Outras	4 (26,7)	1 (5,3)	5 (14,7)	

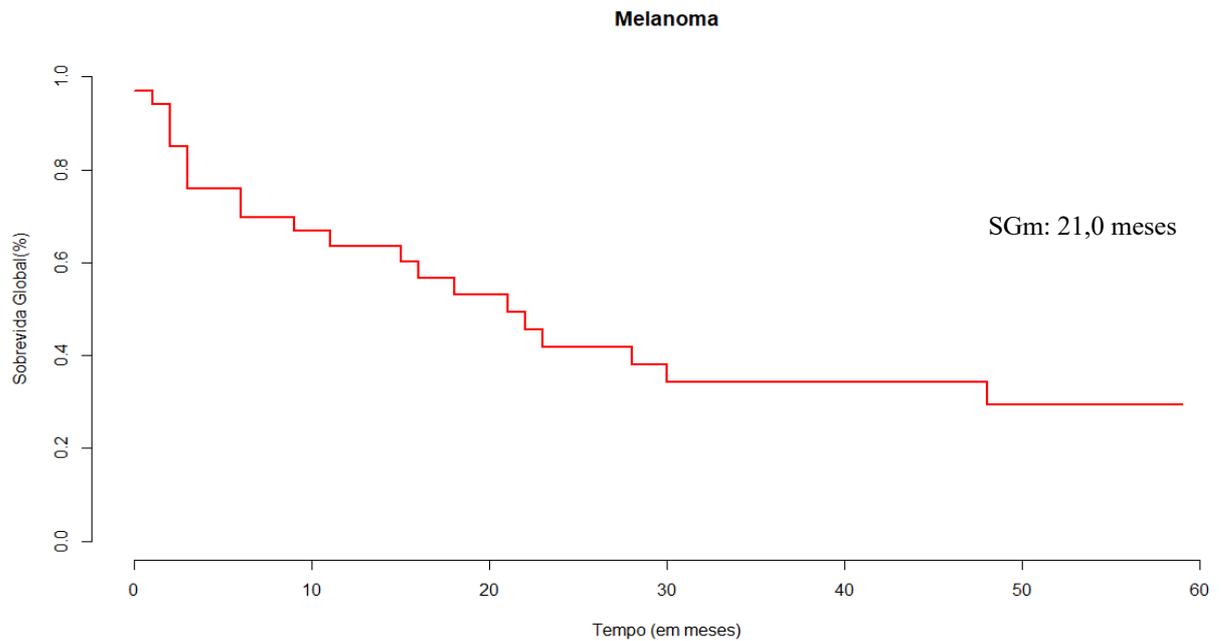
\* Eastern Cooperative Oncology Group performance score-ECOG (pré-nivolumabe).

### 5.2.2 Desfechos Clínicos com o Nivolumabe em Melanoma

O TSm no grupo de melanoma foi de 50 meses. A SLP mediana com o nivolumabe foi de 5,0 meses (IC95%, 2,93-7,06) (Figura 26). A SG mediana foi de 21 meses (IC95%, 12,67-29,32) (Figura 27). As taxas de SG em 12 meses e 24 meses foram de 63,6% e 41,7%, respectivamente.



**Figura 26** - Sobrevida livre de progressão na coorte de melanoma (N=34). O gráfico mostra a curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de progressão, que foi definida como o tempo da primeira dose de nivolumabe até a data da progressão da doença, morte ou última avaliação do tumor.



**Figura 27** - Sobrevida global na coorte de melanoma (N=34). O gráfico mostra a curva de Kaplan-Meier para sobrevida global, que foram definidas como o tempo da primeira dose de nivolumabe até a data da morte de qualquer causa ou última avaliação do tumor.

Na coorte de melanoma, os respondedores ao nivolumabe corresponderam a 44% dos pacientes, enquanto 55,8% dos pacientes foram considerados não respondedores (Tabela 7). A TRO (RC + RP) ao anti-PD-1 foi de, aproximadamente, 26% e 44% dos pacientes apresentaram PD na primeira avaliação de resposta ao tratamento.

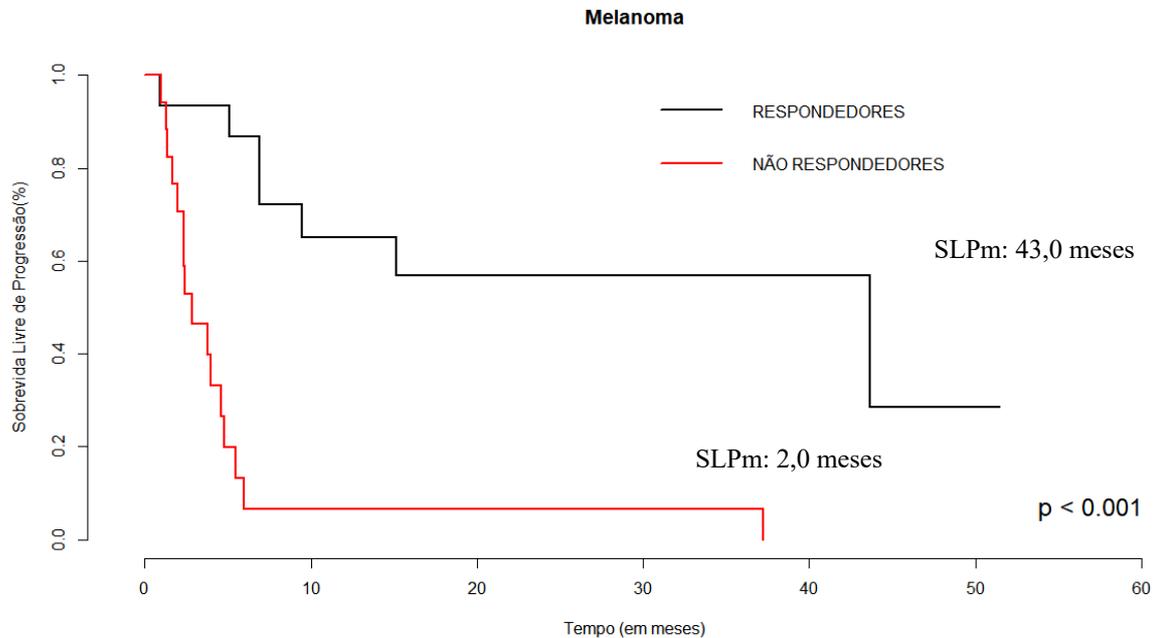
**Tabela 7** - Desfechos de sobrevida e resposta tumoral com o nivolumabe em pacientes com melanoma (N=34)

Desfechos Clínicos	N (%)
<b>Sobrevida Global (meses)</b>	
Mediana	21,0
IC95%	12,67 – 29,32
<b>Sobrevida Livre de Progressão (meses)</b>	
Mediana	5,0
IC95%	2,93 – 7,06
<b>Taxa de Resposta</b>	
<b>Respondedor*</b>	<b>15 (44,1)</b>
Resposta Completa	5 (14,7)
Resposta Parcial	4 (11,7)
Doença Estável $\geq$ 6 meses	6 (17,6)
<b>Não Respondedor*</b>	<b>19 (55,9)</b>
Doença Estável $<$ 6 meses	4 (11,7)
Progressão de Doença	15 (44,1)

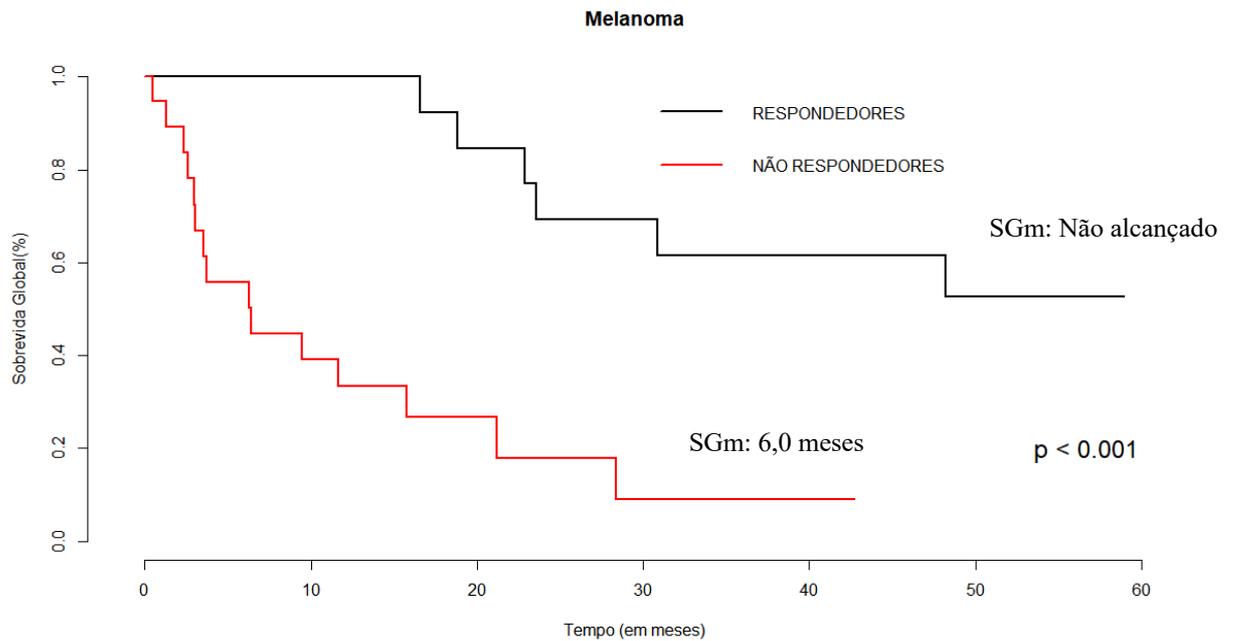
\*Respondedores – Resposta Completa + Resposta Parcial + Doença Estável  $\geq$  6 meses

\*Não Respondedores – Doença Estável  $<$  6 meses + Progressão de Doença

Considerando-se os desfechos de sobrevida, os pacientes respondedores ao anti-PD-1 apresentaram um aumento significativo da SLP (SLPm: 43 meses x 2 meses,  $p < 0,001$ ) e da SG (SGm: não alcançada x 6 meses,  $p < 0,001$ ) comparados com os não-respondedores (Figuras 28 e 29).



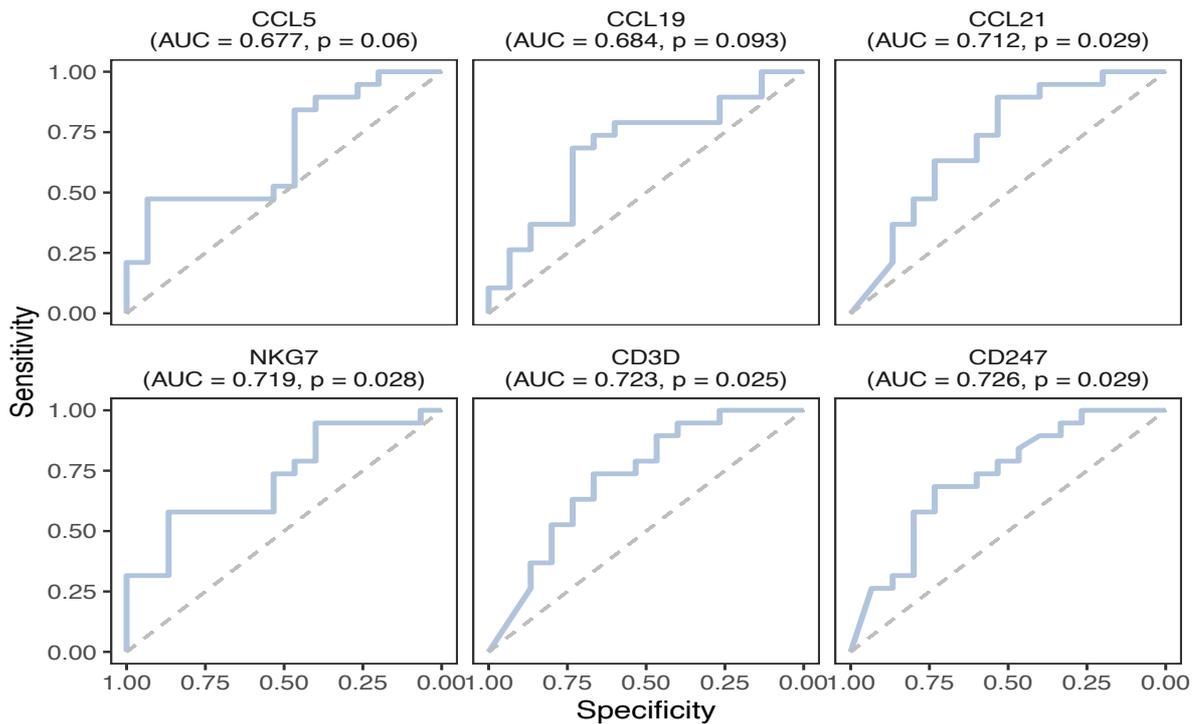
**Figura 28** - Sobrevida livre de progressão nos respondedores e não respondedores ao nivolumabe na coorte de melanoma (N=34). O gráfico mostra a curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de progressão, que foi definida como o tempo da primeira dose de nivolumabe até a data da progressão da doença, morte ou última avaliação do tumor.



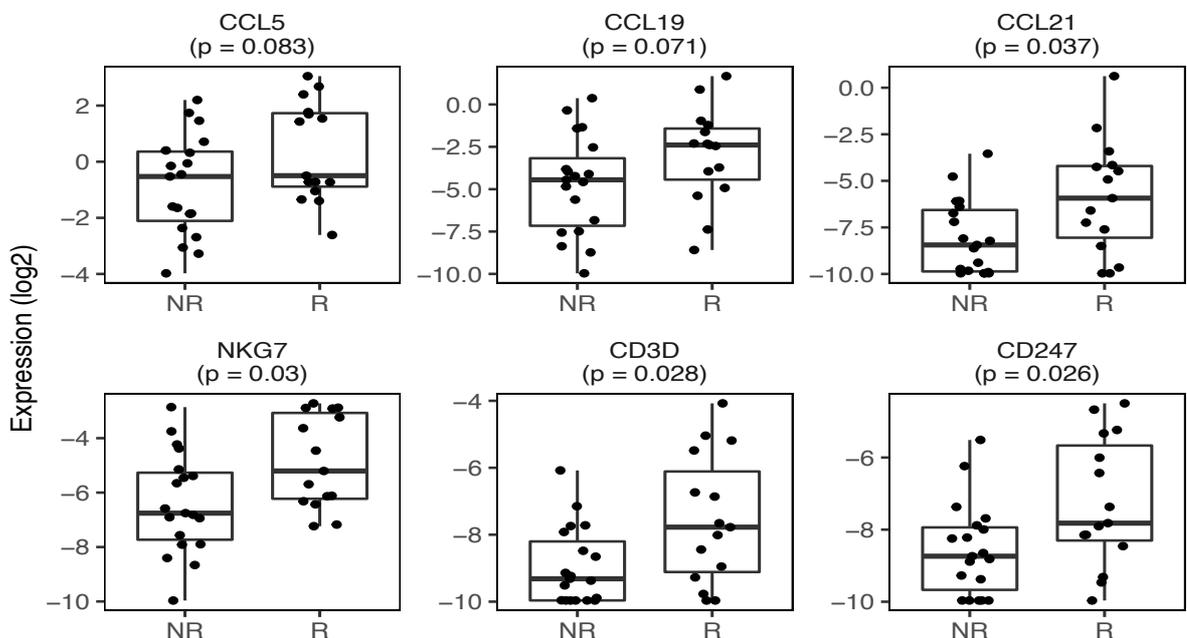
**Figura 29** - Sobrevida global nos respondedores e não respondedores ao nivolumabe na coorte de melanoma (N=34). O gráfico mostra a curva de Kaplan-Meier para sobrevida global, que foi definida como o tempo da primeira dose de nivolumabe até a data da morte por qualquer causa ou última avaliação do tumor.

### 5.2.3 Associação da Expressão Gênica com os Desfechos Clínicos em Melanoma

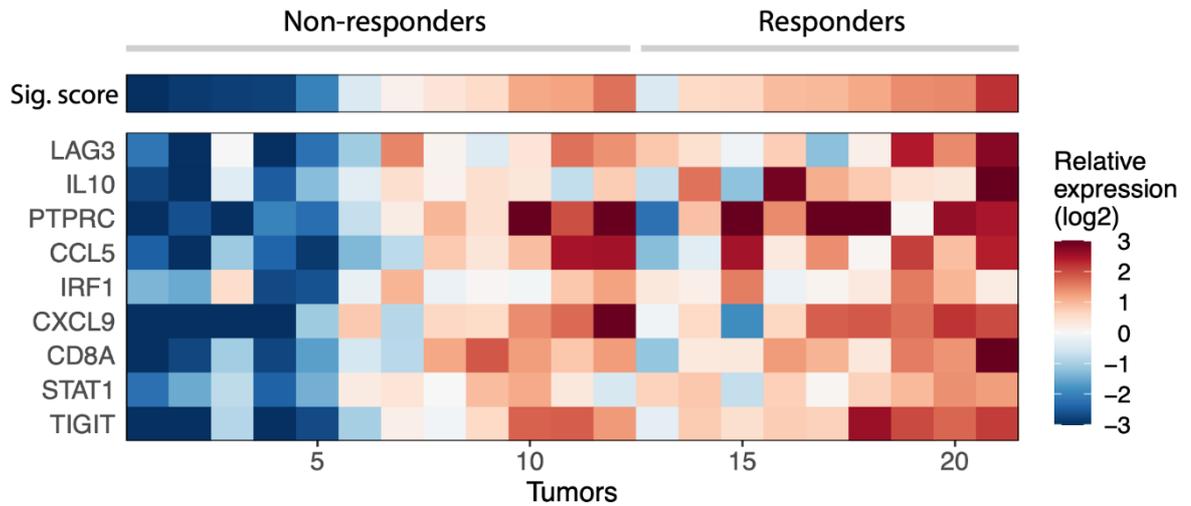
No grupo de melanoma, 34 amostras tiveram o RNA extraído para a análise do perfil de expressão gênica. Dos 41 genes avaliados, apenas a expressão dos genes *CCL19*, *CCL21*, *CCL5*, *CD274*, *CD3D* e *NKG7* apresentou associação com a resposta ao anti-PD-1 ( $p < 0,1$  no teste de Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) (Apêndice 1). E estes genes também foram capazes de prever a resposta ao nivolumabe com AUC acima de 0,68 (Figura 30) e com expressão maior nos respondedores em relação aos não respondedores ( $p < 0,1$ ) (Figura 31). Avaliando a expressão destes genes simultaneamente, foi possível identificar um padrão claro de coexpressão (Figura 32)



**Figura 30** - Curvas ROC demonstrando o poder de predição de resposta da expressão de genes selecionados ( $p < 0,1$  no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) na coorte de melanoma (N=34).

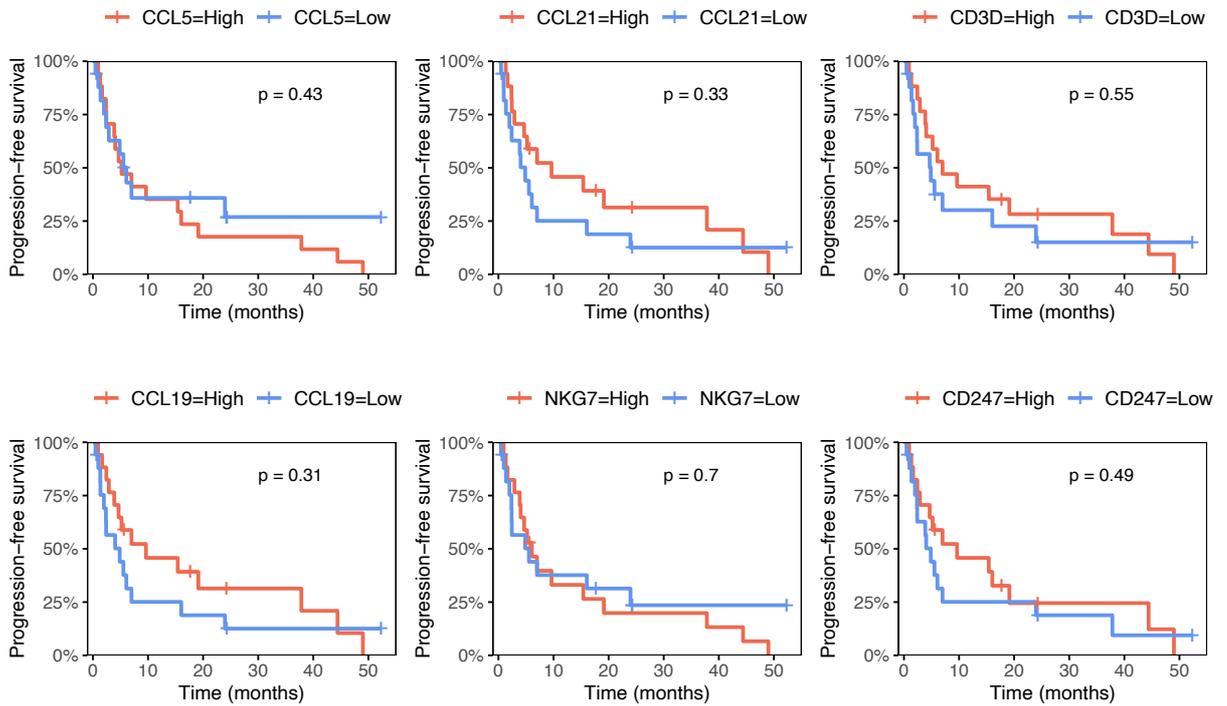


**Figura 31** - *Boxplots* comparando a expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$  no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) em respondedores e não-respondedores ao nivolumabe na coorte de melanoma (N=34). Valores de  $p$  foram calculados com o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney bicaudal.

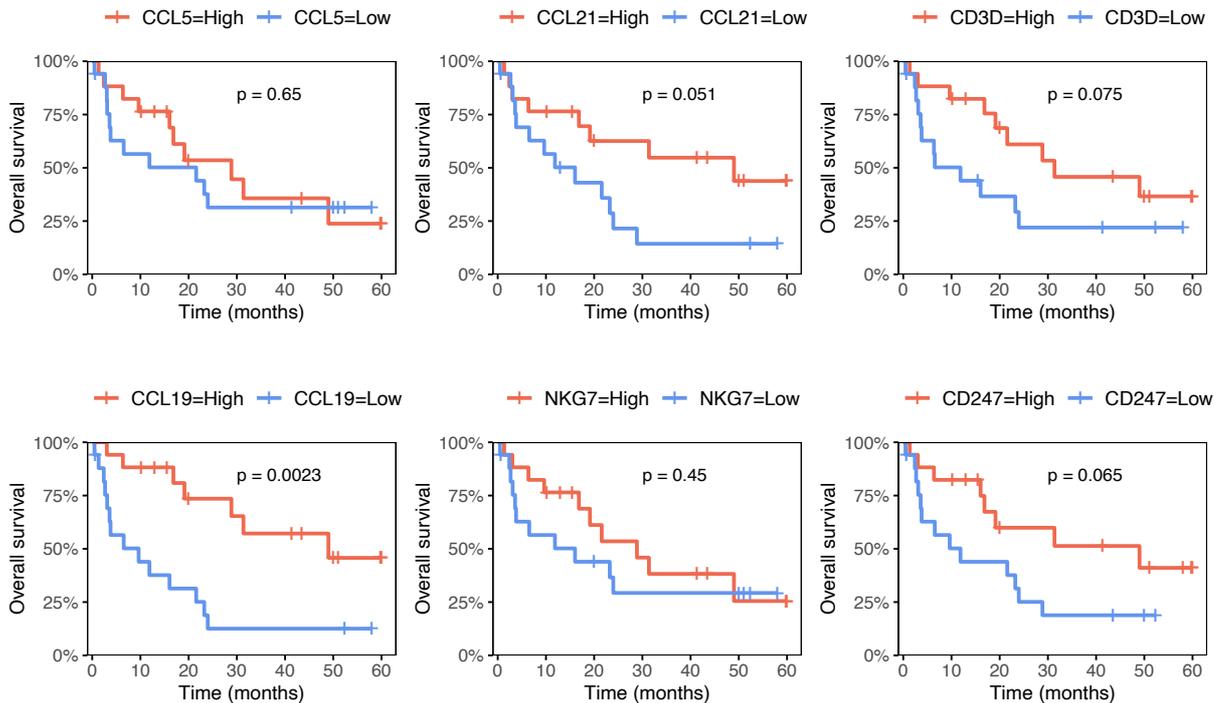


**Figura 32** - *Heatmap* mostrando a expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$  no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) na coorte de melanoma ( $N=34$ ). Os valores de expressão de cada gene foram centralizados subtraindo-se as respectivas médias de expressão. O valor da assinatura gênica mostrada no topo representa a média dos valores centralizados de expressão dos genes no *heatmap*. Os pacientes foram ordenados, em cada grupo, com base no valor da assinatura gênica. Observa-se uma clara maior expressão desse conjunto de genes entre as amostras provenientes de respondedores.

Os níveis de expressão dos genes *CCL19*, *CCL21*, *CCL5*, *CD274*, *CD3D* e *NKG7*, em que a mediana de expressão foi utilizada como ponto de corte, foram avaliados nos desfechos de sobrevida. Os níveis de expressão (alto vs baixo) destes genes não influenciaram os resultados de SLP (Figura 33). Em relação a SG, a alta expressão do *CCL19* associou-se com um benefício em sobrevida estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) comparada com a baixa expressão deste mesmo gene, enquanto a maior expressão dos genes *CCL21*, *CD274* e *CD3D* apresentou uma tendência de associação com um aumento da sobrevida, mas estatisticamente significativa ( $p < 0,1$ ) (Figura 34).

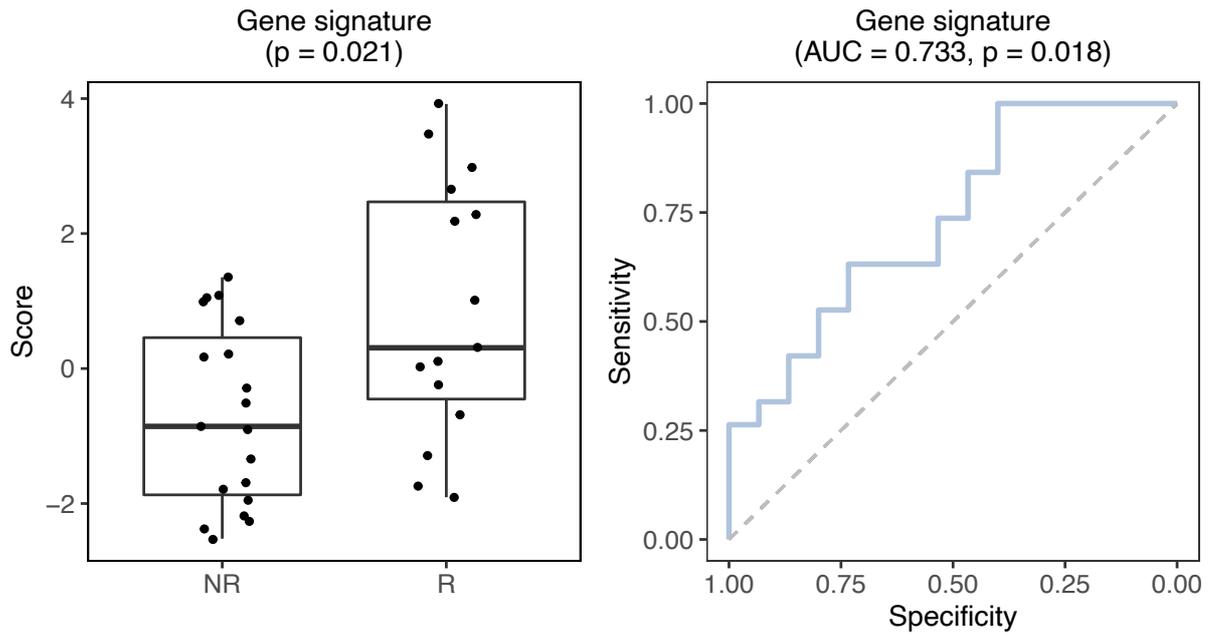


**Figura 33** - Curvas de Kaplan-Meier comparando a SLP em pacientes com alta vs. baixa expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$  no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) na coorte de melanoma ( $N=34$ ). A mediana da expressão foi utilizada como corte para dicotmização dos pacientes. Valores de  $p$  foram calculados com o teste de log-rank.

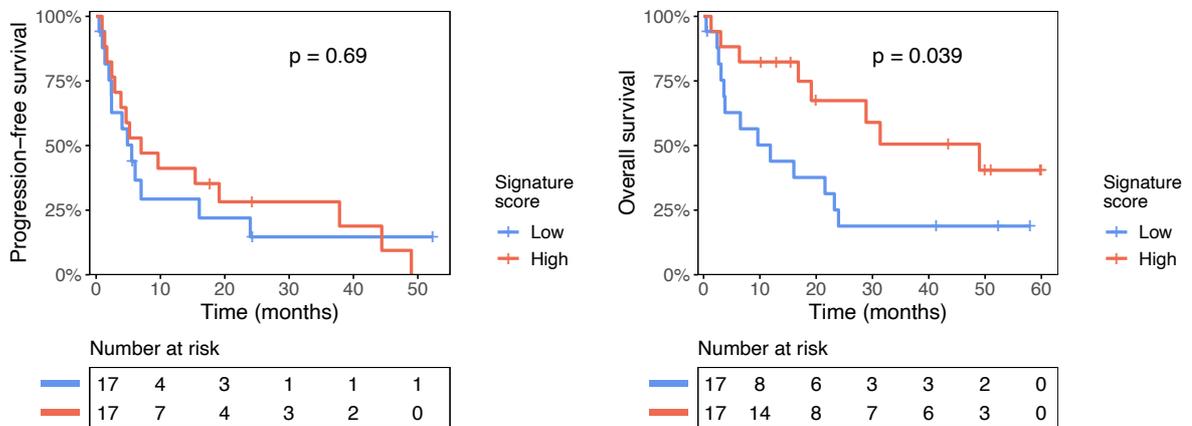


**Figura 34** - Curvas de Kaplan-Meier comparando a SG em pacientes com alta vs. baixa expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$  no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística) na coorte de melanoma ( $N=34$ ). A mediana da expressão foi utilizada como corte para a dicotomização dos pacientes. Valores de  $p$  foram calculados com o teste de log-rank.

A combinação da expressão dos genes *CCL19*, *CCL21*, *CCL5*, *CD274*, *CD3D* e *NKG7* gerou uma assinatura capaz de prever a resposta ao nivolumabe ( $AUC=0,73$ ,  $p=0,018$ ) (Figura 35). O valor desta assinatura gênica, representado pela média dos valores centralizados de expressão dos genes selecionados, foi significativamente maior nos respondedores ( $p=0,021$ ) (Figura 35). Além disso, a SG nos pacientes que apresentaram um alto valor da assinatura foi maior que nos de baixo valor ( $p=0,039$ ) (Figura 36). Tal benefício não foi observado quando o desfecho avaliado foi SLP (Figura 36). A assinatura gênica mostrou-se um fator prognóstico de SG independente do status mutacional de *BRAF* nos tumores e número de metástases (Tabela 8).



**Figura 35** – (1) *Boxplot* comparando o valor da assinatura gênica em respondedores e não-respondedores ao nivolumabe em melanoma (N=34). Valor de p foi calculado com o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney bicaudal. (2) Curva ROC demonstrando o poder de predição de resposta da assinatura gênica. O valor da assinatura gênica representa a média dos valores centralizados de expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$  com teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística).



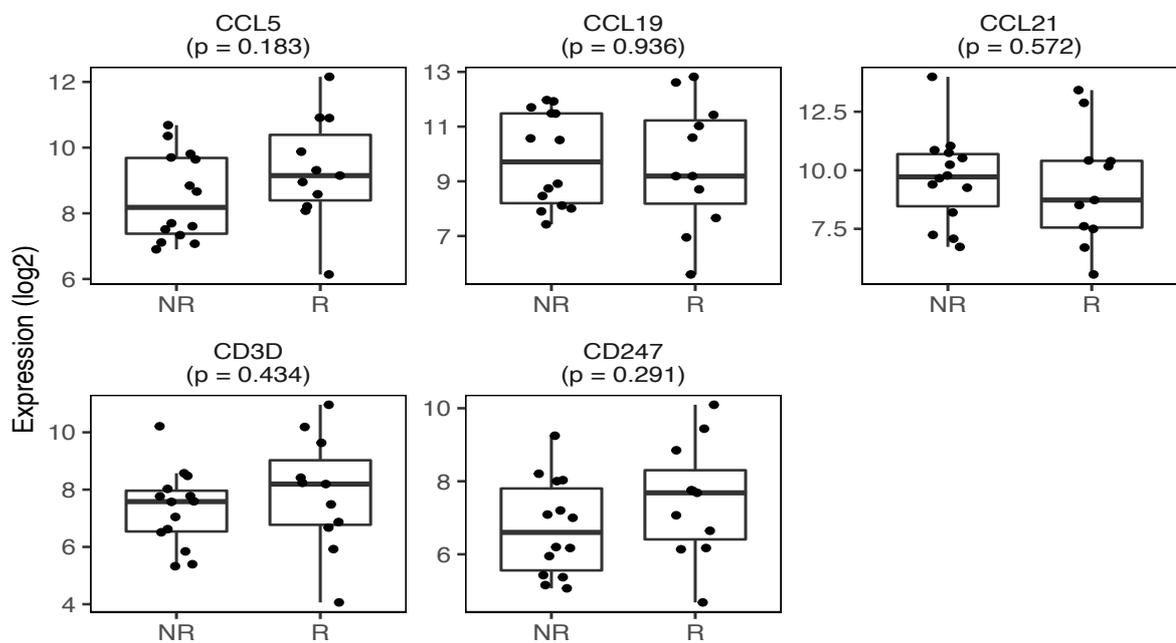
**Figura 36** - Curvas de Kaplan-Meier comparando SLP (1) e SG (2) em pacientes da coorte de melanoma (N=34) com alto vs. baixo valor da assinatura gênica. A mediana da expressão foi utilizada como ponto de corte para a dicotomização dos pacientes). Os valores de p foram calculados com o teste de log-rank. O valor da assinatura gênica representa a média dos valores centralizados de expressão dos genes selecionados ( $p < 0,1$  no teste Wilcoxon-Mann-Whitney e na regressão logística).

**Tabela 8** – Análise multivariada da coorte de melanoma (N=34) comparando a SG de pacientes com alto vs. baixo valor da assinatura gênica por regressão de Cox ajustada para o status de mutação em *BRAF* e número de metástases pré-nivolumabe.

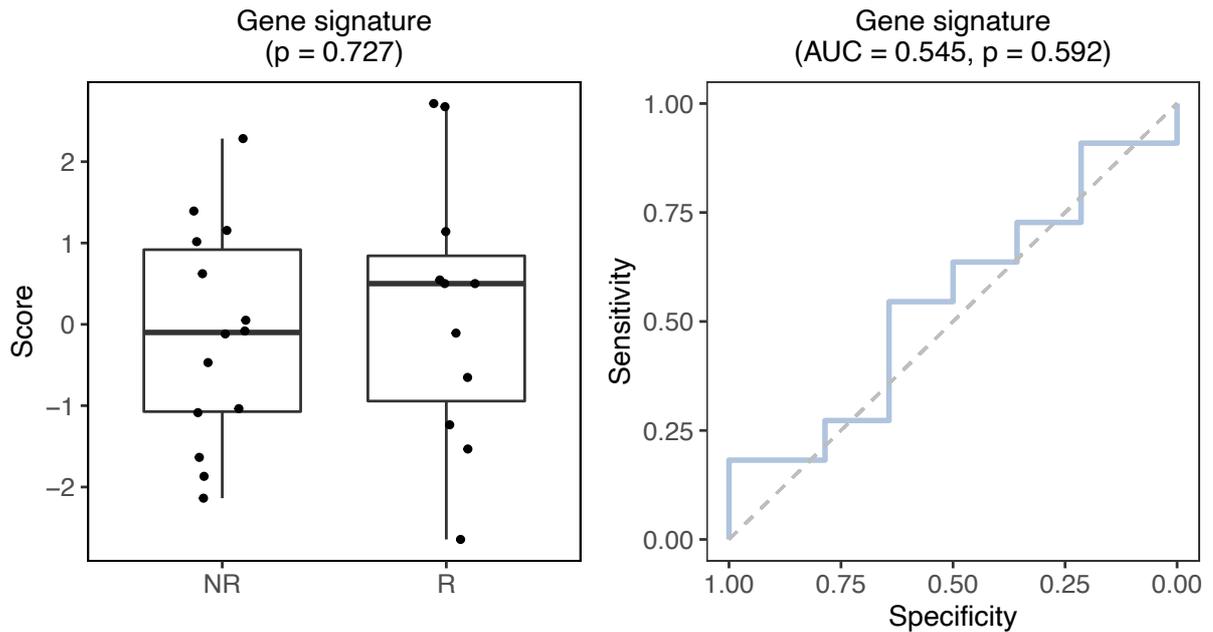
Variáveis	HR	IC95%	p-Valor
BRAF (mt vs wt)	0,67	0,22-2,02	0,48
Número de metástases (3-4 vs 1-2)	1,22	0,51-2,92	0,64
Valor da assinatura (alto vs baixo)	0,49	0,18-1,34	0,16

#### 5.2.4 Validação dos Genes e Assinaturas Gênicas em Melanoma

Para a validação da assinatura gênica encontrada na coorte de melanoma, avaliamos a expressão dos genes *CCL19*, *CCL21*, *CCL5*, *CD274*, *CD3D* e *NKG7* no *dataset* GEO GSE93157. Nesta fase, a expressão destes genes não demonstrou superioridade significativa ( $p < 0,1$ ) nos respondedores em comparação com os não respondedores. Além disso, o valor da assinatura gênica dos respondedores não diferiu dos não respondedores, assim como não demonstrou capacidade de predição de resposta ao anti-PD-1 (Figuras 37 e 38).



**Figura 37** - Boxplots comparando a expressão dos genes selecionados em respondedores e não-respondedores ao nivolumabe na coorte de melanoma (N=25) do banco de dados do GEO GSE93157. Valores de p foram calculados com o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney bicaudal.

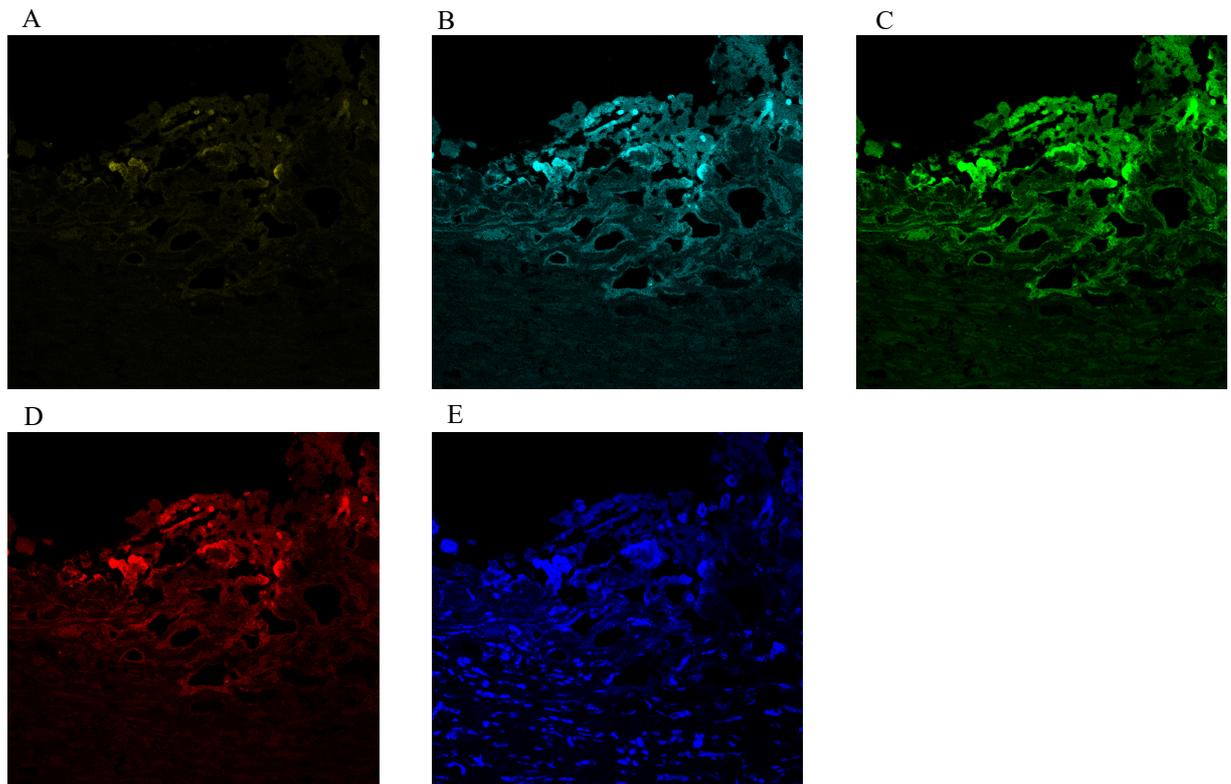


**Figura 38** – (1) *Boxplot* comparando o valor da assinatura gênica em respondedores e não-respondedores ao nivolumabe na coorte de melanoma (N=25) do banco de dados do GEO GSE93157. Valor de p foi calculado com o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney bicaudal. (2) Curva ROC demonstrando o poder de predição de resposta da assinatura gênica validada no banco de dados do GEO GSE93157. O valor da assinatura gênica representa a média dos valores centralizados de expressão dos genes.

### 5.3 ANÁLISE DO INFILTRADO IMUNE TUMORAL POR IMUNOFLUORESCÊNCIA MULTIPLEX

Em decorrência da pandemia de COVID-19, houve atrasos na entrega dos anticorpos, reagentes e insumos que seriam utilizados nesta etapa do projeto do nosso estudo. Além disso, o Laboratório de Microscopia Confocal e Citometria de Fluxo da UNIFESP permaneceu fechado ou com o acesso limitado nas fases mais restritivas do isolamento social. Portanto, não conseguimos concluir a confecção das lâminas de IFm de todas as amostras e, tampouco, capturamos todas as imagens previamente planejadas.

Durante os ensaios de imunofluorescência tivemos dificuldades de padronização das reações. Observamos que algumas marcações dos fluorocromos foram inespecíficas em algumas amostras, enquanto em outras houve falha de marcação ou a amostra apresentou muito *background* (Figura 39).



**Figura 39** – Imunofluorescência multiplex através da tecnologia Zenon em uma amostra tecidual da coorte de CPCNP. A) Anticorpo CK7 conjugado com o AF 555. B) Anticorpo CD3 conjugado com o AF 647. C) Anticorpo PD-1 conjugado com AF 488. D) Anticorpo PD-L1 conjugado com AF 594. E) DAPI

Desta forma, não conseguimos concluir, apesar do pedido de extensão de prazo, essa etapa do projeto. No entanto, tais ensaios continuarão por acreditarmos que eles podem trazer informações valiosas e complementares aos dados de expressão gênica obtidos até agora.

## 6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, os ICIs revolucionaram o tratamento de diversas neoplasias, melhorando o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes oncológicos. Apesar das respostas duradouras e do aumento na sobrevida dos doentes, a eficácia antitumoral da imunoterapia é limitada e a maioria dos pacientes não alcançará uma resposta satisfatória ao tratamento.

No CPCNP metastático, o uso do nivolumabe, após a falha da quimioterapia baseada em platina, demonstrou superioridade em termos de sobrevida comparado com o docetaxel, alcançando uma SG mediana de 9,2 meses na histologia escamosa e 12,2 meses no adenocarcinoma<sup>45,46</sup>. Nesta pequena coorte de pacientes com CPCNP metastático tratados com nivolumabe a partir da segunda linha, a SLP e a SG mediana alcançadas foram de 3 meses e 16 meses, respectivamente, resultados semelhantes aos reportados nos estudos pivotais.

No melanoma metastático tratado previamente com o ipilimumabe (anti-CTLA4), os estudos reportam que o emprego do nivolumabe proporciona uma SLP mediana de 4,7 meses e SG mediana de 37,5.<sup>41,42</sup> Na nossa coorte de melanoma, o tratamento com o nivolumabe trouxe resultados similares aos dos estudos clínicos em relação a SLP (SLPm=5 meses), embora a SG mediana atingida tenha sido de 21 meses.

Neste estudo, apenas 36% dos pacientes com câncer de pulmão foram considerados respondedores ao nivolumabe, enquanto na coorte de melanoma o anti-PD-1 proporcionou uma resposta clínica na ordem de 44%. Como esperado, a SLP e a SG mediana foram significativamente maiores nos respondedores do que nos não respondedores, tanto em câncer de pulmão quanto em melanoma<sup>126,127</sup>. Entretanto, em ambos os grupos, a maioria dos pacientes não obteve benefício da terapia. Portanto, a identificação de biomarcadores capazes de prever sensibilidade à imunoterapia é essencial.

As assinaturas imunes multigênicas podem auxiliar na caracterização do fenótipo inflamatório e do microambiente tumoral, fornecendo elementos cruciais sobre a atividade dos anticorpos monoclonais anti-PD-1/PD-L1 e anti-CTLA4. Diversos estudos demonstram que o perfil de expressão gênica no tumor é capaz de identificar um subgrupo de pacientes que pode se beneficiar da imunoterapia<sup>100,101,123</sup>. Em nosso estudo, analisamos a expressão de 41 genes relacionados com a resposta imune em amostras tumorais parafinadas obtidas pré-nivolumabe através da técnica de RT-qPCR. Identificamos um grupo de genes mais expresso

nos indivíduos que responderam à imunoterapia. Entre os genes que demonstraram associação com a resposta ao nivolumabe, selecionamos aqueles que foram capazes de prever resposta ao ICI em CPCNP (*TIGIT*, *STAT1*, *CD8A*, *CXCL9*, *IRF1*, *CCL5*, *PTPRC*, *IL10* e *LAG3*) e em melanoma (*CCL19*, *CCL21*, *CCL5*, *CD274*, *CD3D* e *NKG7*). Baseado nestes perfis de expressão, nós identificamos uma assinatura gênica para cada coorte que apresentou íntima relação com a resposta e a sobrevida dos pacientes tratados com o nivolumabe.

Hwang et al.<sup>123</sup> analisaram a expressão gênica de 392 genes relacionados à inflamação em 21 amostras de tumor obtidas prospectivamente antes do início do tratamento de pacientes com CPCNP metastático tratados com anti-PD-1, através do *Ion S5TM sequencing kit* (Thermo Fisher Scientific). Duas assinaturas genéticas obtiveram os melhores desempenhos na identificação daqueles pacientes que mais se beneficiaram do ICI em termos de resposta e SLP: assinatura M1 (*CBLB*, *CCR7*, *CD27*, *CD48*, *FOXO1*, *FYB*, *HLA-B*, *HLA-G*, *IFIH1*, *IKZF4*, *LAMP3*, *NFKBIA* e *SAMHD1*) e célula T periférica (*HLA-DOA*, *GPR18* e *STAT1*). Não houve associação destas assinaturas com ganho em SG. Além disso, a expressão dos genes *CD137* e *PSMB9* foi significativamente maior nos indivíduos que alcançaram benefício clínico com a imunoterapia<sup>123</sup>.

O perfil de expressão gênica (GEP) *T-cell inflamed* também foi capaz de prever resposta à terapia anti-PD-1 em diversas neoplasias. Em um estudo conduzido por Cristescu et al.<sup>119</sup>, a expressão de 18 genes relacionados a resposta imune [*CCL5*, *CD27*, *CD274* (*PD-L1*), *CD276* (*B7-H3*), *CD8A*, *CMKLR1*, *CXCL9*, *CXCR6*, *HLA-DQA1*, *HLA-DRB1*, *HLA-E*, *IDO1*, *LAG3*, *NKG7*, *PDCD1LG2* (*PDL2*), *PSMB10*, *STAT1* e *TIGIT*] foi analisada pela plataforma *NanoString nCounter* em amostras de tecidos parafinados obtidas antes da imunoterapia de três coortes (pan-tumor, carcinoma escamoso de cabeça e pescoço e melanoma). Os escores maiores do GEP correlacionaram-se positivamente com taxa de resposta ao ICI em todos os subgrupos tumorais<sup>119</sup>.

Em outro estudo, a análise do GEP por sequenciamento de RNA de amostras de pacientes com carcinoma hepatocelular tratados com o nivolumabe mostrou que a assinatura inflamatória (*CD274*, *CD8A*, *LAG3* e *STAT1*) associou-se com uma maior resposta e sobrevida com o bloqueio do PD1<sup>128</sup>.

Os ensaios para analisar a expressão dos genes foram realizados através da plataforma TLDA, que utiliza a técnica de RT-PCR quantitativa e é capaz de quantificar a expressão de inúmeros genes simultaneamente de amostras de RNA<sup>129</sup>. Tal metodologia dispõe de alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Além disso, os resultados obtidos pelo TLDA não necessitam de validação independente pela técnica de quantificação de mRNA<sup>130</sup>.

Comparado com os outros métodos de análise da expressão gênica como o microarranjo de DNA, o *Nanostring nCounter* e o sequenciamento de RNA, o RT-qPCR é o ensaio mais barato e com o tempo de processamento da amostra mais rápido. O custo estimado para o processamento de cada gene é de aproximadamente \$0,50 e a duração média entre o isolamento do RNA e a análise final dos dados é de 5 horas. Outra vantagem é o valor relativamente baixo de um termociclador, que custa em torno de \$25.000,00. Desta maneira, o RT-qPCR é uma técnica amplamente difundida na prática clínica, disponível inclusive em centros menores, apesar da limitação na quantidade de genes analisados. O bom custo-benefício do método torna o RT-qPCR um teste interessante para o emprego clínico nos países em desenvolvimento e com recursos financeiros limitados <sup>131</sup>. Em nosso estudo, identificamos alguns genes, cuja expressão foi quantificada através de RT-qPCR, que foram capazes em prever a resposta ao ICI em câncer de pulmão e melanoma. Estas assinaturas gênicas, uma vez validadas, poderiam ser amplamente pesquisadas naqueles pacientes candidatos a imunoterapia visto que o RT-qPCR de genes pré-selecionados é um método relativamente simples e barato.

As amostras utilizadas no experimento foram obtidas de tecidos FFPE. Os tecidos parafinados possuem algumas vantagens como a estabilidade na temperatura ambiente, o fácil armazenamento e a disponibilidade. Entretanto, o RNA isolado destas amostras em parafina sofre extensa degradação, podendo comprometer a análise de expressão gênica <sup>132</sup>. Em uma avaliação do perfil gênico pelo TLDA em neoplasias de ovário, a expressão dos genes selecionados nas amostras pareadas de tecidos parafinados e congelados tiveram forte correlação <sup>129</sup>. Em um outro estudo envolvendo pacientes com neoplasia de mama, o RNA extraído de amostras parafinadas demonstrou um nível relativo de expressão gênica semelhante com o material obtido de tecidos frescos e congelados <sup>132</sup>. A normalização adequada dos genes pode compensar os efeitos da degradação do RNA proveniente de tecidos em parafina <sup>132</sup>.

Neste estudo, a análise de expressão dos genes selecionados foi realizada em unicata em todas as amostras em virtude do baixo rendimento do RNA extraído dos tecidos parafinados. Embora o mais adequado para esse tipo de experimento fosse a realização em triplicata ou quadruplicata, os ensaios de RT-qPCR por TLDA possuem pouca variabilidade de resultados de expressão gênica quando duas ou mais cópias do mesmo cDNA são comparadas. Assim, acreditamos que a avaliação da expressão gênica em unicata de amostras de tecidos parafinados pelo TLDA possa ter mínima interferência nos nossos resultados.

A fim de determinar a validade externa das assinaturas encontradas, nós testamos os genes selecionados e as assinaturas genéticas encontradas nos bancos de dados do GEO, confirmando os resultados encontrados nas coortes deste estudo. Possivelmente, estas assinaturas poderiam auxiliar na seleção daqueles pacientes com maiores chances de alcançar algum benefício da terapia imune.

No grupo de câncer de pulmão, a assinatura genética capaz de prever resposta clínica com o ICI é composta por 9 genes relacionados especificamente com recrutamento de células citotóxicas, na ativação e na exaustão do linfócito T. Os genes *CXCL9* e *CCL5* codificam as quimiocinas *CXCL9* e *CCL5*, respectivamente, que atuam no recrutamento de células inflamatórias, especialmente de linfócitos T citotóxicos e células NK <sup>133</sup>. O *CD8A* é um gene que codifica a proteína CD8A, um co-receptor na membrana da célula T que, juntamente com o TCR, reconhece o antígeno apresentado pelas APC no contexto de MHC classe I, ativando as células T citotóxicas <sup>133</sup>. Já o *PTPRC* é o gene que codifica a proteína tirosina-fosfatase, um receptor transmembrana leucocitário fundamental na regulação da sinalização nos linfócitos T e B <sup>133</sup>. Os genes *STAT1* e *IRF1* codificam as proteínas com as mesmas nomenclaturas que, em resposta a estímulos diversos, agem como fatores de transcrição, regulando a expressão de diversos genes em resposta à exposição ao interferon. Em contrapartida, o gene *IL10* codifica a citocina imunossupressora IL10 que é produzida por diversas populações celulares, incluindo macrófagos, DCs e linfócito T reguladores, e possui atividades anti-inflamatórias sobre as células do sistema imunológico e regula a via de sinalização JAK-STAT <sup>133</sup>. Além disso, o *TIGIT* e *LAG3* são genes codificadores das proteínas TIGIT e LAG3 que, ao ligarem-se aos respectivos ligantes, suprimem a ativação dos linfócitos T e, por isso, são denominadas como proteínas de checkpoint imunes <sup>133</sup>. Tal combinação de genes sugere que há um enriquecimento de linfócitos T citotóxicos ativados por interferon e com fenótipo de exaustão nas amostras de tumor de indivíduos com boa resposta à terapia anti-PD-1, um evento já observado empregando-se outras metodologias <sup>100</sup>.

Na coorte de melanoma, os 6 genes que compõem a assinatura gênica estão envolvidos nas vias de recrutamento e ativação de células do sistema imunológico, especialmente dos linfócitos T. Os genes *CCL19*, *CCL21* e *CCL5* codificam as respectivas quimiocinas que, entre outras ações, promovem a migração de linfócitos tanto para os órgãos linfoides periféricos (*CCL19* e *CCL21*) quanto para os tecidos periféricos (*CCL5*) <sup>133</sup>. Já o gene *CD3D* codifica o receptor delta de célula T (*CD3D*) que, juntamente com os receptores de outras subunidades, formam o complexo TCR-CD3 e são fundamentais para a ativação e sinalização das células T. O gene *CD274* codifica o ligante do receptor de morte celular programada 1 (PD-L1) que,

ao interagir com o receptor PD1, inibe a ativação do linfócito T <sup>133</sup>. Finalmente, a proteína NKG7, codificada pelo gene *NKG7*, atua como um importante mediador da inflamação em diversos tipos celulares, como nas células NK e linfócitos T. Aqui também parece haver um enriquecimento de linfócitos T citotóxicos nas amostras de tumor de indivíduos com boa resposta à terapia anti-PD-1, mas também de células NK, associação também já descrita em outros estudos metodologias <sup>100</sup>.

O espectro de genes relacionados com o benefício clínico ao anti-PD-1 neste estudo evidencia a complexa interação do sistema imunológico e os ICIs no microambiente tumoral. Baseado nas assinaturas gênicas descritas nas coortes de CPCNP e melanoma, as vias que possivelmente estão envolvidas neste processo são a via de resposta ao interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) e as vias de recrutamento, ativação e regulação da célula T. O IFN- $\gamma$  é uma citocina secretada principalmente pelas células T CD8 ativadas, linfócito T auxiliar CD4 Th1 e células NK. O IFN- $\gamma$  liga-se aos receptores IFN $\gamma$ R1 e IFN $\gamma$ R2, ativando as Janus Quinase 1 (JAK1) e 2 (JAK2) que, por sua vez, fosforilam o Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1). Consequentemente, a ativação da via JAK/STAT promove a transcrição de inúmeros genes que codificam outros fatores de transcrição, como os Fatores Reguladores de Interferon (IRF), modulando a expressão de diversos genes. No contexto oncológico, os genes regulados pelo IFN- $\gamma$  podem codificar as proteínas com efeitos anti-proliferativos (inibidor de quinase dependente de ciclina p21) e pró-apoptótico (caspase -1, -3, -8). Além disso, nas DCs e macrófagos o IFN- $\gamma$  pode estimular a secreção de quimiocinas, como o CXCL9 e CCL5, potencializando o recrutamento de células T CD8. É importante ressaltar que o IFN- $\gamma$  também está associado com a ativação das células T ao estimular a expressão de receptores coestimuladores, como o CD27. De maneira aparentemente contraditória, as proteínas de *checkpoint* imune, como o PD-L1, TIGIT e LAG3, podem estar hiperexpressas pela ação do IFN- $\gamma$ , no intuito de inibir a ativação das células T <sup>96</sup>. Neste caso, a hiperexpressão desses *checkpoints* pode ser um mecanismo de “contra-regulação”, para evitar um excesso de ativação do sistema imunológico. A expressão do *NKG7* nos respondedores ao anti-PD-1 reforça a participação das células NK e linfócitos T no processo inflamatório/imune no microambiente tumoral <sup>100</sup>. Desta forma, fica evidente que a célula T exerce um papel central no controle imunológico sobre as neoplasias e a expressão de proteínas de *checkpoint* imune no tumor e nas demais células do sistema imune torna o ambiente propício à terapia com inibidores de *checkpoint* imune.

Inúmeros biomarcadores relacionados ao sistema imunológico têm sido investigados no âmbito da imunoterapia no combate ao câncer. Em uma metanálise que avaliou os dados

individuais de 825 pacientes com CPCNP e que receberam algum ICIs, Yu et al.<sup>49</sup> demonstraram que a alta expressão de PD-L1 e o alto TMB correlacionaram-se com um aumento na SLP e na taxa de resposta. O mesmo benefício foi observado na análise combinada destes marcadores. Neste mesmo estudo, a presença das células T CD8<sup>+</sup> no TIL e das mutações dos genes *RYR1* e *MGAM* também tiveram associação com benefício clínico da imunoterapia<sup>49</sup>. Em uma outra metanálise, os dados de exoma/transcriptoma de 1.008 pacientes diagnosticados com câncer, englobando 6 tipos neoplasias, e tratados com ICIs foram revisados<sup>134</sup>. O TMB e a expressão do *CXCL9* foram os biomarcadores com os maiores potenciais na predição de resposta ao ICI<sup>134</sup>. Nosso estudo identificou que os perfis de assinaturas gênicas nas coortes de CPCNP e melanoma associaram-se com resposta e sobrevida nos pacientes tratados com anti-PD-1. Neste contexto, nossos achados poderiam agregar informações complementares frente os estudos mais robustos que avaliaram os biomarcadores em imunoterapia, embora necessitem ser devidamente validados.

Nosso projeto possui diversas limitações. Considerando-se que o desenho do estudo foi retrospectivo e que o número de pacientes e amostras incluídas na análise foi pequeno, os resultados devem ser analisados com cautela. A avaliação de resposta radiológica ao nivolumabe foi um outro fator limitador, uma vez que foi baseada nos laudos dos exames de imagem ou nas informações descritas em prontuário, de maneira retrospectiva, e sem a reavaliação de um médico radiologista. Além disso, o critério radiológico adotado para a avaliação de resposta foi por RECIST, ao invés de imuno-RECIST (iRECIST).

Mais recentemente, nós iniciamos um diálogo com a BMS para a validação das assinaturas gênicas encontradas em CPCNP e melanoma por TLDA em outras coortes de pacientes oncológicos tratados com nivolumabe. Em uma outra etapa do projeto, nós estudaremos a viabilidade de realizar uma validação ortogonal dos resultados encontrados nas nossas amostras com um outro método, como o *NanoString nCounter*, por exemplo.

## **7 ETAPAS FUTURAS DO PROJETO**

A avaliação da composição imune tumoral e a associação com os desfechos clínicos nos pacientes com CPCNP e melanoma tratados com o nivolumabe é um dos objetivos primários do estudo. No entanto, em virtude da pandemia da COVID-19, houve atraso na entrega dos reagentes e insumos, além das restrições no acesso ao Laboratório de Microscopia Confocal e Citometria de Fluxo da UNIFESP, impossibilitando o término dos experimentos de imunofluorescência. Os próximos passos deste estudo incluem a realização das reações de imunofluorescência nos tecidos restantes e a captura das imagens para, finalmente, analisar o infiltrado inflamatório no microambiente tumoral e correlacioná-lo com os dados clínicos dos pacientes que receberam a imunoterapia nos grupos de câncer de pulmão e melanoma.

## 8 CONCLUSÕES

Na coorte de câncer de pulmão, 36,7% dos pacientes foram considerados respondedores (RC + RP + DE >6 meses) e a TRO (RC + RP) foi de 20%. No grupo de melanoma, os respondedores correspondem a 44% dos pacientes, sendo que 26% obtiveram TRO.

Em CPCNP tratados com nivolumabe a SLP mediana alcançada foi de 3 meses e a SG mediana de 16 meses. Já na coorte de melanoma, os pacientes tratados com nivolumabe obtiveram a SLP mediana de 5 meses e a SG mediana de 21 meses.

Na coorte de CPCNP, a expressão dos genes *TIGIT*, *STAT1*, *CD8A*, *CXCL9*, *IRF1*, *CCL5*, *PTPRC*, *IL10* e *LAG3* esteve associado com a resposta ao nivolumabe. A assinatura gênica gerada foi capaz de predizer a resposta ao anti-PD-1 e impactou na SLP e SG dos pacientes.

Em melanoma, os genes *CCL19*, *CCL21*, *CCL5*, *CD274*, *CD3D* e *NKG7* correlacionaram-se com a resposta ao nivolumabe. A assinatura gênica demonstrou a capacidade de predição de resposta à imunoterapia e influenciou os dados de SG.

Os resultados reportados neste estudo sugerem que as assinaturas genéticas identificadas nas coortes de câncer de pulmão e melanoma são potenciais biomarcadores preditivos de benefício clínico ao nivolumabe, sendo, contudo, necessária a confirmação destes achados em estudos prospectivos robustos e com maior número de pacientes.

## 9 REFERÊNCIAS

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(1):7–30.
2. INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil | INCA - Instituto Nacional de Câncer. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2020.
3. Arem H, Loftfield E. Cancer Epidemiology: A Survey of Modifiable Risk Factors for Prevention and Survivorship. *Am J Lifestyle Med.* 2018;12(3):200–10.
4. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000;100:57–70.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74.
6. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252–64.
7. Madden K, Kasler MK. Immune Checkpoint Inhibitors in Lung Cancer and Melanoma. *Semin Oncol Nurs.* 2019;35(5):150932.
8. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Carter A, Casey DC, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet.* 2016;388(10053):1459–544.
9. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang XS, et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: Analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet.* 2015;385(9972):977–1010.
10. Trichopoulos D, Kalandidi A, Sparros L, Brian MacMahon. Lung cancer and passive smoking. *Int J Cancer.* 1981;27(1):1–4.
11. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of Lung Cancer. *Chest* [Internet]. 2003;123(1):21S-49S.
12. Patel JD. Lung cancer in women. *J Clin Oncol.* 2005;23(14):3212–8.
13. Freitas ED De. Aspectos epidemiológicos do câncer de pulmão em uma instituição privada. *Rev Bras Oncol Clínica.* 2010;7:55–9.
14. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of

- Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol.* 2015;10(9):1243–60.
15. Inamura K. Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Front Oncol.* 2017;7(Aug):1–7.
  16. Jemal A, Bray F, Ferlay J. Global Cancer Statistics: 2011. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 1999;49(2):1,33-64.
  17. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(4):212–36.
  18. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, Akerley W, Bauman J, Chirieac LR, et al. Non–Small Cell Lung Cancer, Version 5.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw.* 2017;15(4):504–35.
  19. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ CK (eds). SEER Cancer Statistics Review 1975-2013 National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 1975-2013 National Cancer Institute. SEER Cancer Stat Rev 1975-2013, Natl Cancer Institute Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2013/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/), based Novemb 2015 SEER data submission, posted to SEER web site, April 2016 [Internet]. 2016;1992–2013.
  20. Rigel DS, Russak J, Friedman R. The Evolution of Melanoma Diagnosis: 25 Years Beyond the ABCDs. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(5):301–16.
  21. Domingues B, Lopes J, Soares P, Populo H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther.* 2018;Volume 7:35–49.
  22. Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract.* 2010;2010(1).
  23. Veierød MB, Adami HO, Lund E, Armstrong BK, Weiderpass E. Sun and solarium exposure and melanoma risk: Effects of age, pigmentary characteristics, and nevi. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(1):111–20.
  24. Naik PP. Cutaneous Malignant Melanoma: A Review of Early Diagnosis and Management. *World J Oncol.* 2021;12(1):7–19.
  25. Decker WK, da Silva RF, Sanabria MH, Angelo LS, Guimarães F, Burt BM, et al. Cancer immunotherapy: Historical perspective of a clinical revolution and emerging preclinical animal models. *Front Immunol.* 2017;8(AUG).
  26. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired

- Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* 2017;168(4):707–23.
27. Ribatti D. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget*. 2017;8(4):7175–80.
  28. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer Immunoediting: From Immuno-Surveillance to Tumor Escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991–8.
  29. Demaria O, Cornen S, Daëron M, Morel Y, Medzhitov R, Vivier E. Harnessing innate immunity in cancer therapy. *Nature*. 2019;574(7776):45–56.
  30. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol*. 2016;17(12):e542–51.
  31. Nishino M, Ramaiya NH, Hatabu H, Hodi FS. Monitoring immune-checkpoint blockade: Response evaluation and biomarker development. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(11):655–68.
  32. Abdel-Rahman O. Correlation between PD-L1 expression and outcome of NSCLC patients treated with anti-PD-1/PD-L1 agents: A meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;101:75–85.
  33. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* (80- ). 1996;271(5256):1734–6.
  34. Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(8):711–23.
  35. Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(3):133–50.
  36. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O’Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2517–26.
  37. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, et al. Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2015;33(17):1889–94.
  38. Cottrell TR, Taube JM. PD-L1 and Emerging Biomarkers in Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer J (United States)*. 2018;24(1):41–6.
  39. Remon J, Chaput N, Planchard D. Predictive biomarkers for programmed death-1/programmed death ligand immune checkpoint inhibitors in nonsmall cell lung cancer. *Curr Opin Oncol*. 2016;28(2):122–9.
  40. Robert C, Long G V., Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in

- Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation . *N Engl J Med.* 2015;372(4):320–30.
41. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): A randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(4):375–84.
  42. Ascierto PA, Long G V., Robert C, Brady B, Dutriaux C, Di Giacomo AM, et al. Survival Outcomes in Patients with Previously Untreated BRAF Wild-Type Advanced Melanoma Treated with Nivolumab Therapy: Three-Year Follow-up of a Randomized Phase 3 Trial. *JAMA Oncol.* 2019;5(2):187–94.
  43. Robert C, Schachter J, Long G V., Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2521–32.
  44. Schachter J, Ribas A, Long G V., Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet.* 2017;390(10105):1853–62.
  45. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(2):123–35.
  46. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(17):1627–39.
  47. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet.* 2017;389(10066):255–65.
  48. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1823–33.
  49. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018;378(22):2078–92.
  50. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung

- cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10027):1540–50.
51. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;373(1):23–34.
  52. Hellmann MD, Ciuleanu T-E, Pluzanski A, Lee JS, Otterson GA, Audigier-Valette C, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. *N Engl J Med*. 2018;378(22):2093–104.
  53. Yu Y, Zeng D, Ou Q, Liu S, Li A, Chen Y, et al. Association of Survival and Immune-Related Biomarkers with Immunotherapy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-analysis and Individual Patient-Level Analysis. *JAMA Netw Open*. 2019;2(7):1–17.
  54. Duan J, Cui L, Zhao X, Bai H, Cai S, Wang G, et al. Use of Immunotherapy with Programmed Cell Death 1 vs Programmed Cell Death Ligand 1 Inhibitors in Patients with Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2020;6(3):375–84.
  55. Brito ABC, Camandaroba MPG, de Lima VCC. Anti-PD1 versus anti-PD-L1 immunotherapy in first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Thorac Cancer*. 2021;12(7):1058–66.
  56. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(22):2108–21.
  57. Song P, Zhang D, Cui X, Zhang L. Meta-analysis of immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitor therapy in cancer patients. *Thorac Cancer*. 2020;11(9):2406–30.
  58. Zhang B, Wu Q, Zhou YL, Guo X, Ge J, Fu J. Immune-related adverse events from combination immunotherapy in cancer patients: A comprehensive meta-analysis of randomized controlled trials. *Int Immunopharmacol*. 2018;63(July):292–8.
  59. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89–95.
  60. Wu P, Wu D, Li L, Chai Y, Huang J. PD-L1 and survival in solid tumors: A meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(6):1–15.
  61. Wang A, Wang HY, Liu Y, Zhao MC, Zhang HJ, Lu ZY, et al. The prognostic value

- of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: A meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*. 2015;41(4):450–6.
62. Yu H, Boyle TA, Zhou C, Rimm DL, Hirsch FR. PD-L1 expression in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2016;11(7):964–75.
  63. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti – PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2443–54.
  64. Xu Y, Wan B, Chen X, Zhan P, Zhao Y, Zhang T, et al. The association of PD-L1 expression with the efficacy of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy and survival of non-small cell lung cancer patients: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Transl Lung Cancer Res*. 2019;8(4):413–28.
  65. Campesato LF, Barroso-Sousa R, Jimenez L, Correa BR, Sabbaga J, Hoff PM, et al. Comprehensive cancer-gene panels can be used to estimate mutational load and predict clinical benefit to PD-1 blockade in clinical practice. *Oncotarget*. 2015;6(33):34221–7.
  66. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, Pazdur R. FDA approval summary: Pembrolizumab for the treatment of microsatellite instability-high solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2019;25(13):3753–8.
  67. Lemery S, Keegan P, Pazdur R. First FDA Approval Agnostic of Cancer Site - When a Biomarker Defines the Indication. *N Engl J Med*. 2017;377(15):1409–11.
  68. Bonneville R, Krook MA, Kautto EA, Miya J, Wing MR, Chen H-Z, et al. Landscape of Microsatellite Instability Across 39 Cancer Types. *JCO Precis Oncol*. 2017;(1):1–15.
  69. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509–20.
  70. André T, Shiu K-K, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, et al. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability–High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2020;383(23):2207–18.
  71. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov G V., Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214–8.
  72. Galuppini F, Dal Pozzo CA, Deckert J, Loupakis F, Fassan M, Baffa R. Tumor mutation burden: From comprehensive mutational screening to the clinic. *Cancer Cell Int*. 2019;19(1):1–10.

73. Johnson DB, Frampton GM, Rioth MJ, Yusko E, Xu Y, Guo X, et al. Targeted next generation sequencing identifies markers of response to PD-1 blockade. *Cancer Immunol Res.* 2016;4(11):959–67.
74. Morrison C, Pabla S, Conroy JM, Nesline MK, Glenn ST, Dressman D, et al. Predicting response to checkpoint inhibitors in melanoma beyond PD-L1 and mutational burden. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):1–12.
75. Riaz N, Havel JJ, Makarov V, Desrichard A, Urba WJ, Sims JS, et al. Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab. *Cell.* 2017;171(4):934-949.e15.
76. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science (80- ).* 2015;348(6230):124–8.
77. Kim JY, Kronbichler A, Eisenhut M, Hong SH, van der Vliet HJ, Kang J, et al. Tumor mutational burden and efficacy of immune checkpoint inhibitors: A systematic review and meta-analysis. *Cancers (Basel).* 2019;11(11):1–21.
78. Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, Hellmann MD, Shen R, Janjigian YY, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet.* 2019;51(2):202–6.
79. Rizvi NA, Cho BC, Reinmuth N, Lee KH, Luft A, Ahn MJ, et al. Durvalumab with or Without Tremelimumab vs Standard Chemotherapy in First-line Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: The MYSTIC Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2020;6(5):661–74.
80. Marabelle A, Fakih M, Lopez J, Shah M, Shapira-Frommer R, Nakagawa K, et al. Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *Lancet Oncol.* 2020;21(10):1353–65.
81. Mackay I, Rosen FS. The HLA System. *N Engl J Med.* 2000;343(10):702–9.
82. Johnson DB, Estrada M V., Salgado R, Sanchez V, Doxie DB, Opalenik SR, et al. Melanoma-specific MHC-II expression represents a tumour-autonomous phenotype and predicts response to anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Nat Commun.* 2016;7.
83. McGranahan N, Rosenthal R, Hiley CT, Rowan AJ, Watkins TBK, Wilson GA, et al. Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. *Cell.* 2017;171(6):1259-1271.e11.

84. Chowell D, Morris LGT, Grigg CM, Weber JK, Samstein RM, Makarov V, et al. Patient HLA class I genotype influences cancer response to checkpoint blockade immunotherapy. *Science* (80- ). 2018;359(6375):582–7.
85. Araujo D V., Watson GA, Oliva M, Heirali A, Coburn B, Spreafico A, et al. Bugs as drugs: The role of microbiome in cancer focusing on immunotherapeutics. *Cancer Treat Rev.* 2021;92:102125.
86. Chaput N, Lepage P, Coutzac C, Soularue E, Le Roux K, Monot C, et al. Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Ann Oncol.* 2017;28(6):1368–79.
87. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets T V., et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* (80- ). 2018;359(6371):97–103.
88. Matson V, Fessler J, Bao R, Chongsuwat T, Zha Y, Alegre ML, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* (80- ). 2018;359(6371):104–8.
89. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* (80- ). 2018;359(6371):91–7.
90. Geng Y, Shao Y, He W, Hu W, Xu Y, Chen J, et al. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in lung cancer: A meta-analysis. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37(4):1560–71.
91. Zeng DQ, Yu YF, Ou QY, Li XY, Zhong RZ, Xie CM, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes for clinical therapeutic research in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2016;7(12):13765–81.
92. Fu Q, Chen N, Ge C, Li R, Li Z, Zeng B, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology.* 2019;8(7):1–14.
93. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature.* 2014;515(7528):568–71.
94. Hamid O, Schmidt H, Nissan A, Ridolfi L, Aamdal S, Hansson J, et al. A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. *J Transl Med.* 2011;9(1):1–16.

95. Thommen DS, Koelzer VH, Herzig P, Roller A, Trefny M, Dimeloe S, et al. A transcriptionally and functionally distinct pd-1 + cd8 + t cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with pd-1 blockade. *Nat Med*. 2018;24(7).
96. Hofman P, Badoual C, Henderson F, Berland L, Hamila M, Long-Mira E, et al. Multiplexed immunohistochemistry for molecular and immune profiling in lung cancer—just about ready for prime-time? *Cancers (Basel)*. 2019;11(3):1–22.
97. Lu S, Stein JE, Rimm DL, Wang DW, Bell JM, Johnson DB, et al. Comparison of Biomarker Modalities for Predicting Response to PD-1/PD-L1 Checkpoint Blockade: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2019;5(8):1195–204.
98. Ji RR, Chasalow SD, Wang L, Hamid O, Schmidt H, Cogswell J, et al. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(7):1019–31.
99. Ribas A, Robert C, Hodi FS, Wolchok JD, Joshua AM, Hwu W-J, et al. Association of response to programmed death receptor 1 (PD-1) blockade with pembrolizumab (MK-3475) with an interferon-inflammatory immune gene signature. *J Clin Oncol*. 2015;33(15 suppl).
100. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, et al. IFN- $\gamma$ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest*. 2017;127(8):2930–40.
101. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Kowanetz M, Vansteenkiste J, Mazieres J, et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): A multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10030):1837–46.
102. Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, Hellmann MD, Awad MM, Gainor JF, et al. STK11/LKB1 mutations and PD-1 inhibitor resistance in KRAS-mutant lung adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2018;8(7):822–35.
103. George S, Miao D, Demetri GD, Adeegbe D, Rodig SJ, Shukla S, et al. Loss of PTEN Is Associated with Resistance to Anti-PD-1 Checkpoint Blockade Therapy in Metastatic Uterine Leiomyosarcoma. *Immunity*. 2017;46(2):197–204.
104. Peng W, Chen JQ, Liu C, Malu S, Creasy C, Tetzlaff MT, et al. Loss of PTEN promotes resistance to T cell-mediated immunotherapy. *Cancer Discov*. 2016;6(2):202–16.
105. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma.

- N Engl J Med. 2016;375(9):819–29.
106. Li S, Zhang C, Pang G, Wang P. Emerging Blood-Based Biomarkers for Predicting Response to Checkpoint Immunotherapy in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Front Immunol.* 2020;11.
  107. Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B, Vera-Badillo FE, Aneja P, Ocaña A, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(6).
  108. Jiang T, Qiao M, Zhao C, Li X, Gao G, Su C, et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with outcome of advanced-stage cancer patients treated with immunotherapy: a meta-analysis. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67(5):713–27.
  109. Valero C, Lee M, Hoen D, Weiss K, Kelly DW, Adusumilli PS, et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio and mutational burden as biomarkers of tumor response to immune checkpoint inhibitors. *Nat Commun.* 2021;12(1):1–9.
  110. Li Y, Zhang Z, Hu Y, Yan X, Song Q, Wang G, et al. Pretreatment Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio (NLR) May Predict the Outcomes of Advanced Non-small-cell Lung Cancer (NSCLC) Patients Treated With Immune Checkpoint Inhibitors (ICIs). *Front Oncol.* 2020;10(June):1–13.
  111. Guibert N, Delaunay M, Lusque A, Boubekeur N, Rouquette I, Clermont E, et al. PD-L1 expression in circulating tumor cells of advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab. *Lung Cancer.* 2018;120(April):108–12.
  112. Tamminga M, De Wit S, Hiltermann TJN, Timens W, Schuurung E, Terstappen LWMM, et al. Circulating tumor cells in advanced non-small cell lung cancer patients are associated with worse tumor response to checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):1–9.
  113. Khattak MA, Reid A, Freeman J, Pereira M, McEvoy A, Lo J, et al. PD-L1 Expression on Circulating Tumor Cells May Be Predictive of Response to Pembrolizumab in Advanced Melanoma: Results from a Pilot Study. *Oncologist.* 2020;25(3):520–7.
  114. Bratman S V., Yang SYC, Iafolla MAJ, Liu Z, Hansen AR, Bedard PL, et al. Personalized circulating tumor DNA analysis as a predictive biomarker in solid tumor patients treated with pembrolizumab. *Nat Cancer.* 2020;1(9):873–81.
  115. Aguiar P, Giglio A Del, Perry LA, Penny-Dimri J, Babiker H, Tadokoro H, et al. Cost-effectiveness and budget impact of lung cancer immunotherapy in South America: Strategies to improve access. *Immunotherapy.* 2018;10(10):887–97.

116. Brasil., Tribunal de Contas da União. Relatório de auditoria operacional: Política Nacional de Atenção Oncológica. 2011;132.
117. Oh A, Tran DM, Mc LCD, Keyvani D, Barcelon JA, Merino O, et al. Cost-effectiveness of nivolumab-ipilimumab combination therapy compared with monotherapy for first-line treatment of metastatic melanoma in the United States. *J Manag Care Spec Pharm.* 2017;23(6):653–64.
118. Verma V, Sprave T, Haque W, Simone CB, Chang JY, Welsh JW, et al. A systematic review of the cost and cost-effectiveness studies of immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):1–15.
119. Cristescu R, Mogg R, Ayers M, Albright A, Murphy E, Yearley J, et al. Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science* (80- ). 2018;362(6411).
120. Hellems J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 2008;8(2).
121. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):2002–7.
122. Torrezan GT, Ferreira EN, Nakahata AM, Barros BDF, Castro MTM, Correa BR, et al. Recurrent somatic mutation in DROSHA induces microRNA profile changes in Wilms tumour. *Nat Commun.* 2014;5(May):1–10.
123. Hwang S, Kwon AY, Jeong JY, Kim S, Kang H, Park J, et al. Immune gene signatures for predicting durable clinical benefit of anti-PD-1 immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–10.
124. Prat A, Navarro A, Paré L, Reguart N, Galván P, Pascual T, et al. Immune-related gene expression profiling after PD-1 blockade in non–small cell lung carcinoma, head and neck squamous cell carcinoma, and melanoma. *Cancer Res.* 2017;77(13):3540–50.
125. Aaron JS, Taylor AB, Chew TL. Image co-localization - co-occurrence versus correlation. *J Cell Sci.* 2018;131(3).
126. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol.* 2014;32(10):1020–30.
127. Antonia SJ, Borghaei H, Ramalingam SS, Horn L, De Castro Carpeño J, Pluzanski A, et al. Four-year survival with nivolumab in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer: a pooled analysis. *Lancet Oncol.* 2019;20(10):1395–408.

128. Sangro B, Melero I, Wadhawan S, Finn RS, Abou-Alfa GK, Cheng AL, et al. Association of inflammatory biomarkers with clinical outcomes in nivolumab-treated patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2020;73(6):1460–9.
129. Steg A, Wang W, Blanquicett C, Grunda JM, Eltoum IA, Wang K, et al. Multiple gene expression analyses in paraffin-embedded tissues by TaqMan low-density array. Application to Hedgehog and Wnt pathway analysis in ovarian endometrioid adenocarcinoma. *J Mol Diagnostics*. 2006;8(1):76–83.
130. Josiah O, Gillet J-P, Calcagno A, Ambudkar S, Gottesman M. Correlation between Taqman low density array and oligonucleotide microarrays in measuring multi-drug resistance gene expression levels in the NCI-60 cell lines. *Cancer Res - AACR Annu Meet 2008*. 2008;68(9):Suppl pp3235.
131. Narrandes S, Xu W. Gene expression detection assay for cancer clinical use. *J Cancer*. 2018;9(13):2249–65.
132. Sánchez-Navarro I, Gámez-Pozo A, González-Barón M, Pinto-Marín Á, Hardisson D, López R, et al. Comparison of gene expression profiling by reverse transcription quantitative PCR between fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer tissues. *Biotechniques*. 2010;48(5):389–97.
133. Zhu J, Wang H, Ma T, He Y, Shen M, Song W, et al. Identification of immune-related genes as prognostic factors in bladder cancer. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–13.
134. Litchfield K, Reading JL, Puttick C, Thakkar K, Abbosh C, Bentham R, et al. Meta-analysis of tumor- and T cell-intrinsic mechanisms of sensitization to checkpoint inhibition. *Cell*. 2021;184(3):596-614.e14.

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



COMITÊ DE ÉTICA  
EM PESQUISA - CEP

### APROVAÇÃO

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 **05/12/2017**, **aprovaram** a realização do projeto nº **2465/17** intitulado: "**Correlação entre os desfechos do tratamento com nivolumabe e a composição do infiltrado inflamatório em pacientes portadores de melanoma e câncer de pulmão tratados dentro do Programa de Acesso Expandido.**"

**Pesquisador responsável: Dr. Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima.**

**Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).**

São Paulo, 06 de dezembro de 2017.

Atenciosamente,



**Dr. Jefferson Luiz Gross**  
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

## Apêndice 1 - Tabelas Complementares

Tabela da Informações sobre o rendimento e a qualidade do RNA de amostras de câncer de pulmão dentro do EAP. O RNA foi extraído com o kit AllPrep DNA / RNA FFPE e quantificado em Nanodrop™ ND-1000 usando kits de teste Qubit QUANT-IT dsDNA HS e Qubit QUANT-IT RNA BR. O rendimento de RNA foi satisfatório em 22 amostras.

ID	Nanodrop (Pureza)		Qbit (Rendimento)		
	R 260nm/280nm	R 260nm/230nm	Conc.(ng/ul)	Vol (ul)	Qtd (ng)
<b>CP8710</b>	1,7	0,4	112	25	2800,0
<b>CP7320</b>	1,8	1,0	508	25	12700,0
<b>CP0130</b>	1,5	0,9	124	25	3100,0
<b>CP4360</b>	1,6	0,9	112	25	2800,0
<b>CP2740</b>	1,6	0,4	25,8	25	600,0
<b>CP7670</b>	1,7	1,1	304	25	7600,0
<b>CP7490</b>	1,5	0,8	36,2	25	900,0
<b>CP9190</b>	1,6	0,7	40,4	25	1000,0
<b>CP8930</b>	1,5	0,7	29	25	700,0
<b>CP4720</b>	1,5	0,6	too low	25	-
<b>CP3560</b>	1,6	0,5	30,8	25	800,0
<b>CP6300</b>	1,7	1,2	234	25	5900,0
<b>CP4120</b>	1,6	0,3	37	25	900,0
<b>CP5060</b>	1,4	0,6	32,4	25	800,0
<b>CP7500</b>	1,5	0,2	15,2	25	400,0
<b>CP9185</b>	1,6	0,7	45,8	25	1100,0
<b>CP7010</b>	1,9	1,2	99,8	25	2500,0
<b>CP6980</b>	2,0	1,6	430	25	10800,0
<b>CP0130</b>	1,9	0,4	35,2	25	900,0
<b>CP42640</b>	1,5	0,3	16,39	25	400,0
<b>CP2200</b>	1,5	0,7	13,2	25	300,0
<b>CP8230</b>	1,8	1,0	138	25	3500,0
<b>CP8490</b>	-	-	-	-	0,0

Tabela da Informações sobre o rendimento e a qualidade do RNA de amostras de câncer de pulmão fora do EAP. O RNA foi extraído com o kit AllPrep DNA / RNA FFPE e quantificado em Nanodrop™ ND-1000 usando kits de teste Qubit QUANT-IT dsDNA HS e Qubit QUANT-IT RNA BR. O rendimento de RNA foi satisfatório em 10 amostras.

ID	Nanodrop (Pureza)		Qbit (Rendimento)		
	R 260nm/280nm	R 260nm/230nm	Conc.(ng/ul)	Vol (ul)	Qtd (ng)
<b>CP5116</b>	1,93	0,95	54,2	20	1084,0
<b>CP5453</b>	1,8	0,6	10,6	20	212,0
<b>CP8400</b>	2,0	0,7	46,0	20	920,0
<b>CP8610</b>	1,6	0,7	48,0	20	960,0
<b>CP1840</b>	1,6	0,7	67,6	20	1352,0
<b>CP8930</b>	1,5	0,6	15,7	20	314,0
<b>CP4740</b>	1,9	0,5	64,4	20	1288,0
<b>CP3160</b>	1,6	0,5	15,2	20	304,0
<b>CP9170</b>	1,8	0,2	18,8	20	376,0
<b>CP9210</b>	2,0	0,7	60,8	20	1216,0

Tabela da Informações sobre o rendimento e a qualidade do RNA de amostras de melanoma dentro do EAP. O RNA foi extraído com o kit AllPrep DNA / RNA FFPE e quantificado em Nanodrop™ ND-1000 usando kits de teste Qubit QUANT-IT dsDNA HS e Qubit QUANT-IT RNA BR. O rendimento de RNA foi satisfatório em 28 amostras.

ID	Nanodrop (Pureza)		Qbit (Rendimento)		
	R 260nm/280nm	R 260nm/230nm	Conc. (ng/ul)	Vol (ul)	Qtd (ng)
<b>MEL7450</b>	1,97	1,4	1020,0	25	25500,0
<b>MEL3320</b>	1,87	1,64	1220,0	25	30500,0
<b>MEL2310</b>	1,85	2,27	930,0	25	23200,0
<b>MEL4870</b>	1,84	2,07	2280,0	25	57000,0
<b>MEL2810</b>	1,64	1,06	1700,0	25	42400,0
<b>MEL5100</b>	1,84	1,59	140,0	25	3400,0
<b>MEL1190</b>	1,86	1,71	860,0	25	21600,0
<b>MEL4463</b>	1,77	2,31	640,0	25	16000,0
<b>MEL0970</b>	1,79	1,04	49,6	25	1240,0
<b>MEL4190</b>	1,88	1,62	674,0	25	16850,0
<b>MEL5367</b>	1,89	1,48	716,0	25	17900,0
<b>MEL7400</b>	1,9	0,93	153,0	25	3825,0
<b>MEL8430</b>	1,99	1,34	54,8	25	1370,0
<b>MEL3423</b>	1,52	0,71	13,6	25	340,0
<b>MEL0540</b>	1,69	0,23	30,2	25	755,0
<b>MEL6140</b>	1,5	0,22	10,4	25	260,0
<b>MEL4310</b>	1,55	0,37	too low	25	0,0
<b>MEL1050</b>	1,83	1,66	482,0	25	12050,0
<b>MEL8810</b>	1,73	1,28	45,0	25	1125,0
<b>MEL7060</b>	1,83	1,75	153,0	25	3825,0
<b>MEL3480</b>	1,71	0,66	19,8	25	495,0
<b>MEL3650</b>	1,51	0,85	33,6	25	840,0
<b>MEL4933</b>	1,64	0,99	41,2	25	1030,0
<b>MEL9670</b>	1,58	0,49	5,1	25	127,5
<b>MEL7140</b>	1,8	0,14	too low	25	0,0
<b>MEL7130</b>	1,67	0,38	17,4	25	435,0

<b>MEL6810</b>	1,6	0,29	11,0	25	275,0
<b>MEL7100</b>	1,71	0,91	42,2	25	1055,0
<b>MEL8130</b>	1,84	1,19	30,0	25	750,0
<b>MEL3866</b>	1,57	1,03	164,0	25	4100,0

Tabela da Informações sobre o rendimento e a qualidade do RNA de amostras de melanoma fora do EAP. O RNA foi extraído com o kit AllPrep DNA / RNA FFPE e quantificado em Nanodrop™ ND-1000 usando kits de teste Qubit QUANT-IT dsDNA HS e Qubit QUANT-IT RNA BR. O rendimento de RNA foi satisfatório em 6 amostras.

<b>ID</b>	<b>Nanodrop (Pureza)</b>		<b>Qbit (Rendimento)</b>		
	R 260nm/280nm	R 260nm/230nm	Conc. (ng/ul)	Vol (ul)	Qtd (ng)
<b>MEL5390</b>	1,4	0,1	4,8	25	120,0
<b>MEL7430</b>	1,9	0,4	64,8	25	1620,0
<b>MEL7010</b>	1,4	0,3	6,62	25	165,5
<b>MEL5890</b>	1,8	0,6	126,0	25	3150,0
<b>MEL6500</b>	1,7	0,5	16,5	25	412,5
<b>MEL1810</b>	1,5	0,1	5,18	25	129,5

Tabela da Expressão gênica em amostras de câncer de pulmão dentro do EAP. A análise da expressão dos genes *CCL19*, *CCL2*, *CCL21*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL5*, *CD247* e *CD274* foi realizada através de RT-qPCR (PCR de transcrição reversa quantitativa) usando uma plataforma TLDA (Taqman Low Density Array - Life Technologies). Os resultados da expressão gênica são apresentados como valor log2.

<b>ID</b>	<b><i>CCL19</i></b>	<b><i>CCL2</i></b>	<b><i>CCL21</i></b>	<b><i>CCL3</i></b>	<b><i>CCL4</i></b>	<b><i>CCL5</i></b>	<b><i>CD247</i></b>	<b><i>CD274</i></b>
CP8710	-6,34	-5,92	-7,09	-3,30	-7,61	-1,74	-8,49	-7,45
CP7320	-4,39	-3,46	-9,19	0,83	-4,95	2,18	-6,94	-2,98
CP0130	-0,44	-7,51	-7,40	-0,30	-8,83	-0,46	-7,07	-6,25
CP4360	-3,56	-6,00	-6,86	-1,69	-5,65	1,81	-6,58	-5,66
CP7670	-2,76	-7,82	-10,22	-2,38	-5,68	0,55	-11,87	-5,65
CP9190	-6,82	-6,88		-1,20	-5,01	-0,79	-6,91	-6,81
CP8930	-2,65	-4,78	-5,76	-1,71	-5,13	-1,15	-8,21	-7,98
CP3560	-1,20	-4,07	-6,14	-4,48	-7,22	-0,41	-5,75	
CP6300	-5,64	-8,54		-1,70		-2,26		-7,60
CP4120	-4,72	-6,45	-4,87	-1,44	-7,21	-1,60	-7,69	-6,85
CP5060	1,65		-5,12	-7,14		-1,07	-7,83	-6,40
CP7500	-0,83	-3,29	-6,78	-1,85		-1,31		-8,51
CP9185	-0,45	-5,38	-6,58	-1,30	-5,70	-1,23	-9,00	-8,57
CP7010	-0,88	-6,20	-5,83	-0,53	-3,62	3,38	-5,46	-3,61
CP6980	-2,47	-7,26	-5,41	-0,45	-4,52	1,29	-6,72	-6,00
CP0130	-8,35	-5,61		-1,37	-5,47	-1,69	-8,64	-8,78
CP2640	-1,45	-6,49	-5,11	-3,62	-7,28	-2,24	-8,82	-7,29
CP2200	-1,87	-6,67	-6,91	-3,40	-7,00	-0,74		-7,22
CP8230	-3,62	-6,15	-8,29	-2,54	-8,60	-2,03	-7,70	-5,12
CP5960	-4,01	-8,06	-8,22	-3,61	-8,02	-2,55	-5,57	-8,65

Tabela da Expressão gênica em amostras de câncer de pulmão dentro do EAP. A análise da expressão dos genes *CD3D*, *CD8A*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL13*, *CXCL9*, *DDX58*, *EOMES*, *FOXP3* e *GATA3* foi realizada através de RT-qPCR (PCR de transcrição reversa quantitativa) usando uma plataforma TLDA (Taqman Low Density Array - Life Technologies). Os resultados da expressão gênica são apresentados como valor log2.

ID	<i>CD3D</i>	<i>CD8A</i>	<i>CXCL10</i>	<i>CXCL11</i>	<i>CXCL13</i>	<i>CXCL9</i>	<i>DDX58</i>	<i>EOMES</i>	<i>FOXP3</i>	<i>GATA3</i>
CP8710	-8,75	-3,09	-7,41	-5,93	-9,07	-1,95	-4,04	-9,16	-7,47	-5,95
CP7320	-6,91	-0,36	-3,05	-1,42	-5,93	1,84	-2,50	-5,87	-6,61	-4,01
CP0130	-9,67	-2,69	-6,87	-2,45	-8,07	-0,69	-5,96		-5,37	-3,35
CP4360	-6,49	-1,48	-1,86	0,57	-6,66	2,56	-3,54	-7,44	-5,56	-4,23
CP7670	-8,60	-2,84	-5,02	-2,61	-6,08	0,65	-4,08	-7,04	-6,47	-4,48
CP9190	-7,48	-2,51	-7,10	-6,38	-7,48	-2,53	-6,31	-9,37	-7,86	-6,19
CP8930	-7,92	-4,70	-5,84	-5,45	-6,99	-1,79	-5,30	-9,61	-6,88	-6,40
CP3560	-6,83	-3,65	-4,56	-3,60		-0,62	-4,41	-9,08		-1,58
CP6300		-4,48	-8,10	-6,52		-2,77	-4,44		-13,50	-5,77
CP4120	-10,27	-4,54	-6,57	-5,21	-8,24	-0,48	-5,42	-8,86	-5,88	-4,30
CP5060	-7,06	-3,40				-2,97	-3,15		-4,39	-3,50
CP7500		-3,38	-10,25	-6,38	-6,66	-3,85	-4,65		-3,94	-3,56
CP9185	-8,35	-4,93	-6,92	-4,72	-7,99	-3,63	-4,75	-9,63	-5,37	-4,40
CP7010	-6,13	-0,36	-5,12	-2,10	-5,59	1,12	-3,37	-5,28	-4,52	-2,99
CP6980	-7,46	-2,23	-4,18	-2,30	-4,76	1,01	-5,47	-8,31	-5,32	-4,00
CP0130	-8,99	-4,46	-7,78	-7,49	-10,52	-5,49	-5,64	-9,90	-8,87	-6,73
CP2640	-8,38	-4,60	-7,73	-7,23	-6,37	-3,07	-5,21	-8,77	-7,32	-5,17
CP2200	-8,56	-1,98	-8,01	-4,71	-10,37	-4,92	-4,61		-7,01	-6,68
CP8230	-10,63	-4,73	-8,32	-4,85	-8,65	-3,00	-3,36	-8,87	-6,27	-5,47
CP5960	-9,68	-5,32	-11,24	-9,19	-8,64	-4,35	-6,27	-9,98	-8,10	-4,88

Tabela da Expressão gênica em amostras de câncer de pulmão dentro do EAP. A análise da expressão dos genes *GZMA*, *HLA-DRA*, *HLA-E*, *IDO1*, *IFNG*, *IL10*, *IRF1*, *IRF3* e *IRF7* foi realizada por RT-qPCR (PCR de transcrição quantitativa reversa) usando uma plataforma TLDA (Taqman Low Matriz de densidade - tecnologias da vida). Os resultados da expressão de genes são apresentados como valor log2.

<b>ID</b>	<b><i>GZMA</i></b>	<b><i>HLA-DRA</i></b>	<b><i>HLAE</i></b>	<b><i>IDO1</i></b>	<b><i>IFNG</i></b>	<b><i>IL10</i></b>	<b><i>IRF1</i></b>	<b><i>IRF3</i></b>	<b><i>IRF7</i></b>
CP8710	-5,98	-3,84	-4,07	-6,86	-6,93	-9,40	-3,34	-4,22	-3,77
CP7320	-2,84	-2,29	-3,84	-2,18	-2,81	-6,42	-1,25	-4,90	-3,20
CP0130	-3,02	-3,75	-7,05	-2,43		-9,94	-3,41	-8,05	-4,36
CP4360	-3,22	-2,64	-3,27	-1,48	-4,54	-6,66	-1,17	-4,10	-2,36
CP7670	-5,73	-2,61	-5,58	-3,17	-3,92	-6,75	-2,50	-5,33	-3,80
CP9190	-5,73	-2,38	-3,50	-5,88	-7,04	-7,18	-3,76	-4,56	-5,34
CP8930	-6,15	-1,27	-3,71	-2,51	-9,90	-8,54	-4,16	-5,51	-4,79
CP3560	-4,58	-1,03	-0,95	-6,67	-7,25		-2,75	-5,09	-3,12
CP6300		-3,87	-7,57				-2,81	-9,48	-3,21
CP4120	-5,91	-3,04	-5,03	-5,00	-7,26	-8,10	-3,47	-4,81	-4,04
CP5060	-6,08	-2,92	-6,37				-2,67	-7,02	-3,89
CP7500	-5,81	-3,45	-4,84	-6,02	-8,42	-7,16	-3,56	-5,08	-3,67
CP9185	-6,08	-2,61	-5,05	-7,23	-7,99	-6,70	-3,45	-4,20	-3,39
CP7010	-3,59	-1,35	-3,20	-3,61	-4,92	-6,99	-1,76	-3,28	-3,26
CP6980	-4,39	-1,24	-2,29	-3,78	-6,16	-8,64	-1,94	-5,38	-4,74
CP0130	-7,38	-2,69	-4,31	-8,03	-12,97	-8,76	-4,96	-4,98	-4,08
CP2640	-7,22	-3,20	-3,68	-3,62	-10,41	-9,36	-3,72	-4,49	-4,77
CP2200	-6,76	-3,80	-4,58	-4,84	-8,83		-3,06	-3,82	-4,69
CP8230		-3,39	-5,19	-6,90		-9,32	-2,99	-4,52	-3,02
CP5960	-10,66	-1,85	-4,86	-7,56		-9,35	-4,69	-3,75	-3,95

Tabela da Expressão gênica em amostras de câncer de pulmão dentro do EAP. A análise da expressão dos genes *LAG3*, *MAVS*, *NKG7*, *PRF1*, *PTPRC*, *STAT1*, *TGFBI*, *TIGIT*, *TMEM173* e *TNF* foi realizada por RT-qPCR (PCR de transcrição reversa quantitativa) usando uma plataforma TLDA (*Taqman Low Density Array - Life Technologies*). Os resultados da expressão gênica são apresentados como valor log2.

<b>ID</b>	<b><i>LAG3</i></b>	<b><i>MAVS</i></b>	<b><i>NKG7</i></b>	<b><i>PRF1</i></b>	<b><i>PTPRC</i></b>	<b><i>STAT1</i></b>	<b><i>TGFBI</i></b>	<b><i>TIGIT</i></b>	<b><i>TMEM173</i></b>	<b><i>TNF</i></b>
CP8710	-6,40	-3,28	-5,56	-9,37	-1,61	-0,19	-1,61	-5,33	-6,02	-7,99
CP7320	-3,25	-2,80	-1,55	-6,28	0,16	1,02	0,29	-2,77	-6,34	-7,86
CP0130	-4,22	-3,49	-4,08		-0,71	1,05	-1,11	-2,57	-6,88	-8,82
CP4360	-3,87	-2,91	-3,25	-6,76	0,07	1,91	0,61	-3,09	-6,60	-7,41
CP7670	-5,73	-3,27	-4,65	-10,35	-0,52	0,18	0,86	-4,40	-7,05	-9,44
CP9190	-4,35	-3,72	-3,69	-6,12	-0,94	-0,87	-0,54	-5,97	-5,98	-9,73
CP8930	-6,94	-5,16	-5,76	-9,42	-1,88	-1,22	-0,95	-5,85	-6,70	-9,62
CP3560	-4,48	-3,54	-4,80	-9,00	-1,56	-1,11	-0,76	-6,14	-5,47	
CP6300	-5,99	-1,98	-6,19		-3,55	0,33	1,62	-5,68	-6,54	
CP4120	-6,43	-3,14	-5,44	-9,21	-1,72	-0,52	0,44	-6,14	-7,07	-9,56
CP5060	-4,41	-2,44	-3,85		-0,24	-0,98	0,37	-3,14	-6,29	
CP7500	-6,64	-2,75	-4,96		-0,43	-0,95	0,93	-3,13	-5,80	-7,35
CP9185	-8,34	-4,07	-7,44	-13,14	-0,21	-0,64	0,52	-4,77	-6,70	-7,33
CP7010	-3,35	-3,90	-1,77	-6,56	1,81	0,64	0,71	-1,74	-6,17	-7,10
CP6980	-4,97	-2,89	-3,96	-7,71	0,33	0,02	-0,15	-3,22	-6,81	-9,67
CP0130	-8,70	-4,56	-7,80	-9,53	-1,98	-2,65	-1,09	-8,14	-7,09	-9,20
CP2640	-6,83	-3,03	-6,27	-8,65	-2,22	-1,75	-1,09	-6,83	-7,69	-8,81
CP2200	-7,19	-2,24	-5,12		-1,13	-0,96	-0,26	-5,23	-5,37	-8,78
CP8230	-6,74	-3,10	-7,11		-2,06	-0,96	0,31	-5,07	-5,80	-11,18
CP5960	-8,84	-3,43	-7,82	-9,56	-1,96	-1,58	-1,03	-6,74	-5,92	-9,61

Tabela da Expressão gênica em amostras de câncer de pulmão fora do EAP. A análise da expressão dos genes *CCL19*, *CCL2*, *CCL21*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL5*, *CD247* e *CD274* foi realizada através de RT-qPCR (PCR de transcrição reversa quantitativa) usando uma plataforma TLDA (*Taqman Low Density Array - Life Technologies*). Os resultados da expressão gênica são apresentados como valor log2.

ID	<i>CCL19</i>	<i>CCL2</i>	<i>CCL21</i>	<i>CCL3</i>	<i>CCL4</i>	<i>CCL5</i>	<i>CD247</i>	<i>CD274</i>
<b>CP5116</b>	-6,36	-4,98	-8,47	-0,63	-5,48	0,22	-10,68	-5,04
<b>CP5453</b>	0,49	-1,34	-1,04	1,66	-3,26	3,39		-3,11
<b>CP8400</b>	0,22	-4,71	-4,07	-0,25	-6,74	3,10	-5,24	-5,91
<b>CP8610</b>	-0,17	-7,79	-4,32	1,43	-2,85	2,18		-5,47
<b>CP1840</b>	1,03	-3,25	-2,70	-0,40	-4,19			-3,93
<b>CP8930</b>	-1,44	-4,27	-6,05	-0,24	-5,44	0,63	-6,75	-5,26
<b>CP4740</b>	1,39	-4,56	-2,03	-0,03	-3,06	3,84	-4,56	-5,78
<b>CP3160</b>	-4,99	-6,31	-7,54	0,94	-4,70	1,00	-3,80	-4,46
<b>CP9170</b>	-0,83	-6,13	-5,01	-1,29	-3,76	0,39	-7,12	-2,81
<b>CP9210</b>	-0,15	-5,42	-3,70	0,67	-3,24	3,79	-5,16	-6,50

Tabela da Expressão gênica em amostras de câncer de pulmão fora do EAP. A análise da expressão dos genes *CD3D*, *CD8A*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL13*, *CXCL9*, *DDX58*, *EOMES*, *FOXP3* e *GATA3* foi realizada através de RT-qPCR (PCR de transcrição reversa quantitativa) usando uma plataforma TLDA (*Taqman Low Density Array - Life Technologies*). Os resultados da expressão gênica são apresentados como valor log2.

ID	<i>CD3D</i>	<i>CD8A</i>	<i>CXCL10</i>	<i>CXCL11</i>	<i>CXCL13</i>	<i>CXCL9</i>	<i>DDX58</i>	<i>EOMES</i>	<i>FOXP3</i>	<i>GATA3</i>
<b>CP5116</b>	-8,53	-5,16	-6,74	-2,62	-9,33	-1,59	-2,91			-5,09
<b>CP5453</b>	-4,46	0,52	-3,51	-0,54		0,23	-0,77	-6,20	-2,90	-0,13
<b>CP8400</b>	-8,90	-0,61	-7,07			-1,69	-3,56	-6,18	-6,52	-2,16
<b>CP8610</b>	-7,25	-1,18	-7,34	-7,17	-2,38	-0,21	-3,34	-9,34		-3,36
<b>CP1840</b>	-5,76	0,24	-6,00	-2,14	-3,81		-4,23	-9,13	-6,23	-2,62
<b>CP8930</b>	-7,90	-2,66	-7,79	-5,61	-9,28	-3,39	-4,00	-7,21	-6,11	-3,57
<b>CP4740</b>	-5,28	0,98	-4,42	-2,66	-2,98	2,21	-2,68	-5,39	-3,64	-1,67
<b>CP3160</b>	-8,17	-2,18	-5,41	-3,02		-0,41	-7,13	-8,05	-5,28	-3,09
<b>CP9170</b>	-7,78	-2,53	-7,32	-2,93	-9,49	-1,11	-2,93		-3,47	-0,34
<b>CP9210</b>	-5,05	-0,30		-3,94	-2,39	-2,04	-8,31	-4,44	-4,51	-5,05

Tabela da Expressão gênica em amostras de câncer de pulmão fora do EAP. A análise da expressão dos genes *GZMA*, *HLA-DRA*, *HLA-E*, *IDO1*, *IFNG*, *IL10*, *IRF1*, *IRF3* e *IRF7* foi realizada através de RT-qPCR (PCR de transcrição reversa quantitativa) usando uma plataforma TLDA (*Taqman Low Density Array - Life Technologies*). Os resultados da expressão gênica são apresentados como valor log2.

ID	<i>GZMA</i>	<i>HLA-DRA</i>	<i>HLAE</i>	<i>IDO1</i>	<i>IFNG</i>	<i>IL10</i>	<i>IRF1</i>	<i>IRF3</i>	<i>IRF7</i>
CP5116	-6,27	-1,54	-5,06	-1,69		-10,31	-1,56	-5,10	-2,76
CP5453	-4,00	-1,87	-1,38	0,26	-3,90	-3,01	0,59	-0,82	0,49
CP8400	-4,39	0,17	-2,33	-3,44		-4,69	-1,85	-1,31	-1,15
CP8610		-0,09	-3,73				-1,07	-3,88	-2,12
CP1840	-2,27	-0,14	-2,31		-6,45	-6,38	-0,93	-4,52	-2,88
CP8930	-5,66	0,14	-2,53	-1,88		-7,29	-3,01	-2,40	-2,02
CP4740	-1,49	1,28	-1,13	-0,93	-5,99	-9,50	-0,09	-3,34	-2,68
CP3160	-4,32	-2,32	-2,55	-3,05	-5,73		-1,12	-3,32	-3,85
CP9170	-7,38	-2,19	-2,57	-1,87	-5,63	-5,09	-0,75	-2,82	-1,86
CP9210	-4,98	1,03	-3,47	-2,44	-4,67		-1,84	-3,59	-2,28

Tabela da Expressão gênica em amostras de câncer de pulmão fora do EAP. A análise da expressão dos genes *LAG3*, *MAVS*, *NKG7*, *PRF1*, *PTPRC*, *STAT1*, *TGFBI*, *TIGIT*, *TMEM173* e *TNF* foi realizada através de RT-qPCR (PCR de transcrição reversa quantitativa) usando uma plataforma TLDA (*Taqman Low Density Array - Life Technologies*). Os resultados da expressão gênica são apresentados como valor log2.

ID	<i>LAG3</i>	<i>MAVS</i>	<i>NKG7</i>	<i>PRF1</i>	<i>PTPRC</i>	<i>STAT1</i>	<i>TGFBI</i>	<i>TIGIT</i>	<i>TMEM173</i>	<i>TNF</i>
CP5116	-6,77	-1,82	-7,08		-0,44	-0,48	2,07	-6,16	-6,24	
CP5453	-3,75	2,64	-2,43	-4,91	2,45	2,13	4,38	-1,95	-4,20	
CP8400	-1,77	0,59	-4,86	-7,25	1,91	0,06	3,37	-3,16	-4,42	-7,37
CP8610	-1,64	0,68	-6,53	-6,26	1,35	0,33	3,04	-2,35	-5,12	
CP1840	-3,64	0,10	-2,49	-5,00	2,18	-0,30	1,92	-1,66	-4,63	
CP8930	-7,25	-2,03	-5,45	-6,59	0,44	-0,20	1,01	-3,95	-4,38	-9,64
CP4740	-2,70	-1,09	-0,49	-4,69	2,99	1,54	2,91	-1,24	-3,88	
CP3160	-8,78	-0,32	-2,67	-7,78	0,69	0,44	3,24	-3,83	-8,53	
CP9170	-4,34	0,39	-4,00	-8,01	1,58	1,15	4,90	-3,11	-6,13	-7,45
CP9210		0,21	-4,40	-5,90	2,39	-0,85	2,28	-1,78	-4,08	-6,50

Tabela da Expressão gênica em amostras de melanoma dentro do EAP. A análise da expressão dos genes *CCL19*, *CCL2*, *CCL21*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL5*, *CD247* e *CD274* foi realizada através de RT-qPCR (PCR de transcrição reversa quantitativa) usando uma plataforma TLDA (*Taqman Low Density Array - Life Technologies*). Os resultados da expressão gênica são apresentados como valor log2.

<b>ID</b>	<b><i>CCL19</i></b>	<b><i>CCL2</i></b>	<b><i>CCL21</i></b>	<b><i>CCL3</i></b>	<b><i>CCL4</i></b>	<b><i>CCL5</i></b>	<b><i>CD247</i></b>	<b><i>CD274</i></b>
<b>MEL7450</b>	-9,53	-9,08	-11,01	-2,21	-9,51	-2,70	-9,39	-8,40
<b>MEL3320</b>	-3,98			-1,85		-3,07		-5,63
<b>MEL2310</b>	-4,61	-10,60		-4,92	-13,98	-4,00	-10,95	-10,89
<b>MEL4870</b>	-4,13			-2,94	-8,32	-2,37	-9,68	
<b>MEL2810</b>	-7,64	-9,91		-1,53	-7,80	-1,05	-10,78	-12,76
<b>MEL5100</b>	0,37	-7,69	-3,56	-3,35	-7,99	-1,65	-7,63	-5,98
<b>MEL1190</b>	-7,01	-6,87	-9,34	-2,29	-7,30	-0,45	-6,35	-9,44
<b>MEL4463</b>	-4,88	-7,43	-8,73	-3,60	-6,68	-0,53	-9,81	-9,24
<b>MEL0970</b>	1,67	-9,35	0,62	-1,84	-5,53	1,69	-5,39	-5,88
<b>MEL4190</b>	-4,97	-10,75	-12,03	-6,13	-10,71	-2,62	-11,23	-9,59
<b>MEL5367</b>	-3,84	-7,34	-8,56	-0,34	-5,35	1,74		-6,37
<b>MEL7400</b>	-4,48	-7,53	-7,43	0,08	-6,47	-0,15		-6,76
<b>MEL8430</b>	-2,31	-5,27	-4,51	0,53	-4,64	2,40	-5,29	-5,95
<b>MEL3423</b>	-0,97	-6,83	-3,43	-0,23	-6,13	1,54	-8,19	-11,91
<b>MEL0540</b>	0,88	-5,80	-2,17	1,08	-4,93	1,43	-4,71	-6,16
<b>MEL6140</b>	-9,29	-6,25		-1,73	-6,41	-0,72	-6,56	-7,17
<b>MEL1050</b>	-5,69	-7,32	-12,48	-4,10	-8,08	-1,85		-7,86
<b>MEL8810</b>	-2,33	-8,18	-4,18	-1,15	-7,99	-1,35		-6,86
<b>MEL7060</b>	-4,26	-5,17	-6,90	-2,83	-6,61	0,32	-8,27	-6,29
<b>MEL3480</b>	-2,54	-6,27	-6,52	-1,10	-7,05	1,46	-8,02	
<b>MEL3650</b>	-1,22	-5,22	-4,97	1,37	-3,35	3,05	-6,10	-5,34
<b>MEL4933</b>	-2,40	-7,41	-6,02	-3,71	-8,25	-1,40	-8,63	-8,08
<b>MEL9670</b>	-0,35	-5,77	-6,18	-0,92	-5,46	0,40		-6,14
<b>MEL7130</b>	-7,86	-8,00	-14,43	-2,73	-6,05	-1,86	-9,54	-9,61
<b>MEL6810</b>		-6,28		2,85	-1,28	-1,60	-8,77	-7,66
<b>MEL7100</b>	-1,42	-7,52	-6,20	0,35	-4,67	2,20	-5,58	-7,46
<b>MEL8130</b>	-3,97	-6,46	-7,48	-2,31	-7,50	-0,72	-8,30	-7,05
<b>MEL3866</b>	-1,63	-5,14	-4,28	-1,66	-4,14	2,68	-4,53	-6,49

Tabela da Expressão gênica em amostras de melanoma dentro do EAP. A análise da expressão dos genes *CD3D*, *CD8A*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL13*, *CXCL9*, *DDX58*, *EOMES*, *FOXP3* e *GATA3* foi realizada através de RT-qPCR (PCR de transcrição reversa quantitativa) usando uma plataforma TLDA (*Taqman Low Density Array - Life Technologies*). Os resultados da expressão gênica são apresentados como valor log2.

<b>ID</b>	<b>CD3D</b>	<b>CD8A</b>	<b>CXCL10</b>	<b>CXCL11</b>	<b>CXCL13</b>	<b>CXCL9</b>	<b>DDX58</b>	<b>EOMES</b>	<b>FOXP3</b>	<b>GATA3</b>
<b>MEL7450</b>		-5,68	-9,70	-7,06	-8,77	-4,50	-7,80	-10,38	-10,04	-6,89
<b>MEL3320</b>		-4,15			-9,09	-2,24	-4,55	-9,29		
<b>MEL2310</b>		-6,51				-5,99	-7,54	-7,05	-9,23	-5,46
<b>MEL4870</b>	-10,78	-5,98	-10,17			-0,55	-9,92		-9,12	-7,98
<b>MEL2810</b>		-4,98		-6,77	-9,02	-4,86	-7,33	-7,46	-7,44	-8,62
<b>MEL5100</b>	-8,06	-3,79	-8,29	-5,07	-9,38	0,02	-5,67	-9,15	-6,90	-6,13
<b>MEL1190</b>		-4,80	-7,88			-1,91	-4,97	-9,14		
<b>MEL4463</b>	-9,12	-3,57	-7,00	-6,30	-9,80	-2,28	-5,42	-8,49	-7,72	-7,49
<b>MEL0970</b>	-4,10	-1,53	-6,68	-2,50	-2,47	0,00	-3,84	-6,99	-7,11	-2,75
<b>MEL4190</b>		-5,81		-7,81		-3,39	-8,05		-10,76	-8,00
<b>MEL5367</b>	-8,09	-2,27	-3,99	-2,07	-6,94	2,20	-5,18	-8,47	-9,71	-5,98
<b>MEL7400</b>		-3,61	-5,23	-4,27	-7,20	0,10	-5,53	-7,92	-7,87	-8,14
<b>MEL8430</b>	-7,04	-0,78	-2,98	-0,95	-6,03	2,37	-5,27	-6,87	-8,28	-4,81
<b>MEL3423</b>	-6,90	-2,36	-5,27	-2,12	-7,12	0,11	-5,41	-6,69	-5,66	-5,38
<b>MEL0540</b>	-5,24	-0,39	-8,74	-3,61	-4,24	-0,08	-5,35	-6,44	-5,30	-2,80
<b>MEL6140</b>	-10,67	-3,28	-8,10			-2,31	-4,78		-9,19	-6,38
<b>MEL1050</b>	-11,41	-5,57	-6,38	-5,26	-9,48	-4,03	-3,57	-10,05	-10,90	-6,25
<b>MEL8810</b>	-7,98	-5,72	-5,70	-2,55	-7,95	-0,39	-5,19		-6,31	-6,01
<b>MEL7060</b>	-9,40	-3,42	-4,71	-4,19	-7,63	-0,69	-4,31	-7,71	-6,79	-6,35
<b>MEL3480</b>	-10,34	-1,20	-7,27	-5,89	-6,47	0,95	-4,11	-6,89	-5,41	-2,20
<b>MEL3650</b>	-5,55	-0,65	-3,13	-1,75	-3,67	2,23	-5,06	-5,92	-5,76	-3,43
<b>MEL4933</b>	-9,06	-4,42	-7,40	-5,86	-9,25	-1,71	-5,56	-8,83	-8,90	-5,28
<b>MEL9670</b>	-7,37	-2,49	-6,46	-4,01	-6,22	0,87	-5,00	-6,56	-9,00	-2,66
<b>MEL7130</b>	-10,56	-5,19	-5,29	-4,05	-11,79	-1,42	-7,60	-8,55	-9,37	-7,57
<b>MEL6810</b>	-17,79	-4,73	-7,53	-7,66	-8,76	-3,93	-6,77	-7,18	-10,33	-7,76
<b>MEL7100</b>	-6,18	-1,68	-5,40	-4,11	-5,32	0,23	-5,07	-6,58	-6,89	-3,94
<b>MEL8130</b>	-12,75	-2,97	-7,13	-6,29	-10,17	-1,14	-6,40	-9,28		-7,90
<b>MEL3866</b>	-5,09	-1,92	-5,84	-4,13	-5,76	0,40	-5,68	-3,76	-5,61	-4,03

Tabela da Expressão gênica em amostras de melanoma dentro do EAP. A análise da expressão dos genes *GZMA*, *HLA-DRA*, *HLA-E*, *IDO1*, *IFNG*, *IL10*, *IRF1*, *IRF3* e *IRF7* foi realizada por RT-qPCR (PCR de transcrição quantitativa reversa) usando uma plataforma TLDA (*Taqman Low Density Array – Life Technologies*). Os resultados da expressão gênica são apresentados como valor log2.

<b>ID</b>	<b><i>GZMA</i></b>	<b><i>HLA-DRA</i></b>	<b><i>HLAE</i></b>	<b><i>IDO1</i></b>	<b><i>IFNG</i></b>	<b><i>IL10</i></b>	<b><i>IRF1</i></b>	<b><i>IRF3</i></b>	<b><i>IRF7</i></b>
<b>MEL7450</b>	-9,25	-4,52	-4,99	-9,38	-8,31	-9,12	-5,31	-3,91	-6,97
<b>MEL3320</b>	-4,10	-6,09	-4,83				-3,20		-2,74
<b>MEL2310</b>	-8,16	-7,09	-4,86				-5,52	-4,42	-5,10
<b>MEL4870</b>	-5,59	-10,89	-7,57	-8,78			-5,40	-7,65	-9,56
<b>MEL2810</b>	-7,68	-4,04	-5,01	-8,17		-8,58	-5,73	-5,65	-5,49
<b>MEL5100</b>	-7,43	-4,72	-6,21	-4,60	-7,15	-9,71	-3,77	-5,40	-4,04
<b>MEL1190</b>		-5,55	-4,07	-7,16		-7,17	-3,84	-5,42	-3,51
<b>MEL4463</b>	-6,67	-2,83	-1,95	-7,64	-9,30	-7,70	-4,55	-4,22	-4,72
<b>MEL0970</b>	-4,83	-0,61	-3,52	-3,24	-6,98	-8,02	-3,28	-4,05	-2,88
<b>MEL4190</b>	-9,63	-6,40	-6,19	-8,04		-11,24	-6,47	-5,78	-9,85
<b>MEL5367</b>	-5,92	-2,52	-4,07	-3,12	-5,67	-10,10	-2,62	-5,95	-4,70
<b>MEL7400</b>	-7,86	-3,32	-3,90	-4,70	-6,90	-6,85	-3,17	-4,59	-4,31
<b>MEL8430</b>	-5,01	-2,26	-2,43	-3,22	-4,65	-9,18	-1,52	-4,16	-4,58
<b>MEL3423</b>	-5,51	-2,63	-3,92	-5,36	-6,60		-3,27	-5,42	-5,47
<b>MEL0540</b>	-4,91	-1,06	-3,82	-3,38	-3,60	-5,45	-2,08	-5,01	-3,97
<b>MEL6140</b>	-8,40	-5,05	-4,94	-8,31	-7,86	-9,37	-4,24	-4,87	-4,43
<b>MEL1050</b>	-8,00	-3,04	-3,51	-9,62	-9,71	-8,55	-4,00	-6,46	-3,63
<b>MEL8810</b>	-7,02	-4,36	-5,75	-6,39	-10,08		-4,69	-5,41	-4,89
<b>MEL7060</b>	-7,15	-0,86	-2,74	-4,44	-6,68	-10,97	-2,16	-4,84	-4,25
<b>MEL3480</b>	-4,42	-3,07	-3,86	-5,18	-3,54	-8,81	-1,88	-4,07	-3,02
<b>MEL3650</b>	-3,68	-0,24	-2,97	-1,81	-3,70	-6,68	-1,53	-4,48	-3,36
<b>MEL4933</b>	-6,64	-2,56	-3,67	-7,24	-9,29	-8,89	-3,80	-3,43	-5,20
<b>MEL9670</b>	-5,38	-2,19	-4,29	-5,27	-5,04	-7,55	-2,39	-4,52	-4,47
<b>MEL7130</b>	-7,72	-3,62	-3,64	-6,60	-8,93	-8,98	-5,07	-6,10	-7,32
<b>MEL6810</b>	-9,10	-2,79	-3,29	-5,37	-10,03	-8,68	-3,42	-5,00	-5,16
<b>MEL7100</b>	-4,63	1,28	-2,05	-4,50	-6,54	-6,32	-3,71	-4,36	-4,65
<b>MEL8130</b>	-6,23	-3,79	-3,89	-6,31	-5,56	-7,80	-4,01	-5,59	-5,33
<b>MEL3866</b>	-4,50	1,67	-1,06	-4,37	-3,37	-4,87	-2,53	-2,70	-4,84

Tabela da Expressão gênica em amostras de melanoma dentro do EAP. A análise da expressão dos genes *LAG3*, *MAVS*, *NKG7*, *PRF1*, *PTPRC*, *STAT1*, *TGFB1*, *TIGIT*, *TMEM173* e *TNF* foi realizada por RT-qPCR (PCR de transcrição reversa quantitativa) usando uma plataforma TLDA (*Taqman Low Density Array - Life Technologies*). Os resultados da expressão gênica são apresentados como valor log2.

ID	<i>LAG3</i>	<i>MAVS</i>	<i>NKG7</i>	<i>PRF1</i>	<i>PTPRC</i>	<i>STAT1</i>	<i>TGFB1</i>	<i>TIGIT</i>	<i>TMEM173</i>	<i>TNF</i>
MEL7450	-7,57	-1,94	-7,87	-8,92	-2,63	-3,19	-1,74	-6,31	-9,05	-14,18
MEL3320	-4,70	-2,89	-6,73		-0,66	-1,18	-1,14	-8,39	-8,01	
MEL2310	-9,06	-2,77	-9,41	-12,80	-4,01	-2,05	-0,81	-7,23	-6,24	
MEL4870	-5,83	-4,91	-7,13		-3,34	-2,35	-2,92	-6,38	-9,37	
MEL2810		-3,78	-7,40		-2,88	-1,71	-2,57	-6,22	-6,64	
MEL5100	-5,63	-2,89	-5,45	-10,12	-0,72	-0,92	-0,49	-4,22	-7,74	-9,72
MEL1190		-3,35	-6,92		-2,13	-0,77	-0,22	-14,02	-6,96	-7,91
MEL4463	-7,40	-3,25	-5,52	-10,27	-2,14	-1,38	-0,63	-5,53	-5,63	-8,59
MEL0970	-4,46	-2,01	-4,49	-7,89	2,95	-0,04	1,94	-1,97	-7,45	-8,60
MEL4190	-8,81	-3,03	-7,47	-14,50	-3,66	-2,71	-2,49	-8,09	-6,92	
MEL5367	-4,80	-1,83	-4,26	-7,84	-0,24	0,78	0,16	-3,82	-6,73	-8,70
MEL7400	-7,44	-1,26	-6,99	-11,34	-1,70	-0,05	-0,13	-5,80	-6,92	-11,31
MEL8430	-4,32	-1,83	-3,25	-6,81	0,39	1,06	1,41	-2,82	-9,08	-8,26
MEL3423	-5,13	-2,97	-2,90	-12,63	0,55	0,45	-0,60	-3,86	-8,46	-8,74
MEL0540	-4,44	-3,24	-2,92	-6,17	2,38	0,26	1,55	-2,33	-7,40	-7,15
MEL6140	-7,48	-2,02	-6,24	-9,51	-0,77	-1,98	0,42	-6,55	-7,34	-8,86
MEL1050	-10,19	-1,49	-9,00	-10,29	-2,56	-1,12	0,96	-6,46	-5,67	-12,13
MEL8810	-7,21	-2,89	-6,22	-8,56	-1,42	-0,72	-0,59	-5,72	-6,93	-10,40
MEL7060	-5,90	-3,58	-5,20	-8,90	-0,71	-0,28	-0,84	-3,91	-7,51	-9,24
MEL3480	-7,78	-1,11	-2,87	-8,26	0,47	-0,19	1,44	-3,22	-6,94	-8,80
MEL3650	-3,81	-2,96	-2,89	-5,50	1,73	1,21	0,63	-3,00	-6,64	-7,37
MEL4933	-6,75	-2,70	-6,56	-9,88	-1,65	-1,96	-1,38	-5,71	-5,74	-9,50
MEL9670	-4,75	-2,65	-4,41	-8,67	0,21	-0,03	0,48	-3,91	-6,69	-6,97
MEL7130	-8,60	-2,69	-7,09	-10,06	-3,61	-2,08	-3,27	-8,47	-7,59	-12,06
MEL6810	-7,50	-2,13	-8,31	-10,63	-1,15	-1,50	-1,54	-7,81	-6,75	-6,45
MEL7100	-4,96	-3,70		-5,34	1,06	-0,73	-0,23	-3,90	-6,53	-9,02
MEL8130	-6,20	-2,18	-5,26	-12,02	-2,35	-0,74	-1,21	-6,65	-8,36	-9,11
MEL3866	-4,08	-2,04	-2,73	-4,42	0,98	-1,07	-0,60	-2,71	-7,17	-12,61

Tabela da Expressão gênica em amostras de melanoma fora do EAP. A análise da expressão dos genes *CCL19*, *CCL2*, *CCL21*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL5*, *CD247* e *CD274* foi realizada por RT-qPCR (PCR de transcrição reversa quantitativa) usando uma plataforma TLDA (*Taqman Low Density Array - Life Technologies*). Os resultados da expressão gênica são apresentados como valor log2.

<b>ID</b>	<b><i>CCL19</i></b>	<b><i>CCL2</i></b>	<b><i>CCL21</i></b>	<b><i>CCL3</i></b>	<b><i>CCL4</i></b>	<b><i>CCL5</i></b>	<b><i>CD247</i></b>	<b><i>CD274</i></b>
<b>MEL5390</b>	-3,74	-9,68	-6,74	2,61	-3,57	1,77	-7,63	-5,91
<b>MEL7430</b>	-8,95	-7,89	-13,28	-3,95	-9,16	-3,29	-10,66	-14,29
<b>MEL7010</b>	-1,35	-7,73	-4,81	-2,07	-8,41	-0,06	-8,42	-5,55
<b>MEL5890</b>	-7,77	-5,96	-9,06	-0,81	-6,23	0,71	-8,73	-7,08
<b>MEL6500</b>	-5,45	-4,77	-7,92	-0,36	-7,85	-0,73	-9,08	-8,38
<b>MEL1810</b>	-2,46	-8,90	-9,15	-3,57	-7,36	-0,50	-8,62	-7,74

Tabela da Expressão gênica em amostras de melanoma fora do EAP. A análise da expressão dos genes *CD3D*, *CD8A*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL13*, *CXCL9*, *DDX58*, *EOMES*, *FOXP3* e *GATA3* foi realizada por RT-qPCR (PCR de transcrição reversa quantitativa) usando uma plataforma TLDA (*Taqman Low Density Array - Life Technologies*). Os resultados da expressão gênica são apresentados como valor log2.

<b>ID</b>	<b><i>CD3D</i></b>	<b><i>CD8A</i></b>	<b><i>CXCL10</i></b>	<b><i>CXCL11</i></b>	<b><i>CXCL13</i></b>	<b><i>CXCL9</i></b>	<b><i>DDX58</i></b>	<b><i>EOMES</i></b>	<b><i>FOXP3</i></b>	<b><i>GATA3</i></b>
<b>MEL5390</b>	-8,13	-1,21	-9,89	-4,22	-9,78	-3,25	-6,13	-9,43		-7,76
<b>MEL7430</b>	-14,16	-6,34	-11,01	-8,13	-14,19	-7,82	-8,46	-8,39	-11,59	-13,20
<b>MEL7010</b>	-10,94	-4,12	-6,44	-3,43	-9,86	-0,73	-4,45	-7,27	-6,36	-1,33
<b>MEL5890</b>	-8,32	-2,52	-4,12	-3,44	-6,41	-0,25	-5,81	-7,75	-8,01	-5,09
<b>MEL6500</b>	-9,94	-4,99	-7,74	-7,08	-9,54	-3,21	-6,25		-7,99	-7,58
<b>MEL1810</b>	-8,44	-4,66	-5,19	-4,29	-8,72	-0,80	-7,27	-7,58	-7,36	-4,43

Tabela da Expressão gênica em amostras de melanoma fora do EAP. A análise da expressão dos genes *GZMA*, *HLA-DRA*, *HLA-E*, *IDO1*, *IFNG*, *IL10*, *IRF1*, *IRF3* e *IRF7* foi realizada por RT-qPCR (PCR de transcrição reversa quantitativa) usando uma plataforma TLDA (*Taqman Low Density Array - Life Technologies*). Os resultados da expressão gênica são apresentados como valor log2.

<b>ID</b>	<b><i>GZMA</i></b>	<b><i>HLA-DRA</i></b>	<b><i>HLAE</i></b>	<b><i>IDO1</i></b>	<b><i>IFNG</i></b>	<b><i>IL10</i></b>	<b><i>IRF1</i></b>	<b><i>IRF3</i></b>	<b><i>IRF7</i></b>
<b>MEL5390</b>	-5,12	0,48	-4,44	-7,81	-7,35	-6,00	-4,02	-6,60	-5,80
<b>MEL7430</b>	-10,09	-6,17	-5,85	-10,33	-11,76	-	-6,05	-7,38	-8,09
<b>MEL7010</b>	-6,25	-3,06	-4,18	-5,96	-7,92	11,26	-3,34	-4,80	-4,08
<b>MEL5890</b>	-4,54	-1,93	-2,83	-4,64	-7,35	-8,63	-2,82	-4,79	-4,91
<b>MEL6500</b>	-7,56	-0,25	-3,94	-7,05		-7,40	-4,70	-6,01	-6,08
<b>MEL1810</b>	-6,96	-3,23	-4,20	-7,57	-9,82	-9,11	-4,94	-4,96	-7,85

Tabela da Expressão gênica em amostras de melanoma fora do EAP. A análise da expressão dos genes *LAG3*, *MAVS*, *NKG7*, *PRF1*, *PTPRC*, *STAT1*, *TGFB1*, *TIGIT*, *TMEM173* e *TNF* foi realizada por RT-qPCR (PCR de transcrição reversa quantitativa) usando uma plataforma TLDA (*Taqman Low Density Array - Life Technologies*). Os resultados da expressão gênica são apresentados como valor log2.

<b>ID</b>	<b><i>LAG3</i></b>	<b><i>MAVS</i></b>	<b><i>NKG7</i></b>	<b><i>PRF1</i></b>	<b><i>PTPRC</i></b>	<b><i>STAT1</i></b>	<b><i>TGFB1</i></b>	<b><i>TIGIT</i></b>	<b><i>TMEM173</i></b>	<b><i>TNF</i></b>
<b>MEL5390</b>	-5,66	-2,76	-3,65	-7,32	1,52	-1,32	1,29	-4,21	-7,29	
<b>MEL7430</b>	-9,62	-3,34	-8,29	-	-4,70	-3,71	-2,00	-11,65	-7,95	
<b>MEL7010</b>	-7,44	-3,04	-5,73	-9,42	-0,68	-0,40	0,01	-4,88	-7,64	-7,91
<b>MEL5890</b>	-5,10	-2,20	-3,77	-6,31	-1,20	-0,32	-1,19	-4,68	-9,25	-
<b>MEL6500</b>	-8,00	-2,00	-6,44	-8,83	-1,19	-2,99	0,14	-6,05	-9,27	10,85
<b>MEL1810</b>	-7,44	-3,29	-5,77	-8,95	-2,35	-1,17	-0,77	-6,20	-7,27	

Tabela da Expressão gênica em respondedores e não-respondedores em CPCNP. Comparação da expressão gênica em respondedores e não-respondedores por teste de Wilcoxon-Mann-Whitney bicaudal.

	<b>mean.R</b>	<b>mean.NR</b>	<b>log2fc</b>	<b>p</b>
<i>BCR</i>	-4.24721102883728	-4.76456270477358	0.517351675936302	0.219893135873047
<i>CCL19</i>	-0.66069285219933	-1.06514585315963	0.404453000960295	0.779655372758632
<i>CCL2</i>	-4.48630074063431	-4.37002101054953	-0.116279730084773	0.982830348076583
<i>CCL21</i>	-4.82143462135534	-5.12228563160346	0.300851010248123	0.413324652110553
<i>CCL3</i>	0.551788343949906	-0.188197416408685	0.73998576035859	0.015011494393304
<i>CCL4</i>	-4.29666027147565	-4.97146346433271	0.674803192857054	0.085028727801268
<i>CCL5</i>	2.46587062070927	0.688448564110224	1.77742205659904	0.037353045089177
<i>CD247</i>	-6.58474072674476	-6.28692028914355	-0.29782043760121	0.948327264848975
<i>CD274</i>	-4.12886866653883	-5.0869488469567	0.958080180417862	0.112282906165965
<i>CD3D</i>	-5.9172259109068	-6.73128297970636	0.814057068799556	0.097464334869328
<i>CD8A</i>	-0.439065397775789	-1.5718386374695	1.13277323969371	0.067361652219607
<i>CXCL10</i>	-4.4845738633591	-5.66994845184966	1.18537458849056	0.219893135873047
<i>CXCL11</i>	-2.77325620691406	-3.45857553292191	0.685319326007849	0.590566200333813
<i>CXCL13</i>	-5.35288702627858	-6.64809093646072	1.29520391018214	0.15393614686343
<i>CXCL9</i>	1.0052490976015	-1.06098882226766	2.06623791986916	0.047690254730494
<i>CXCR6</i>	-9.11182259419828	-9.09074879904009	-0.021073795158193	0.928458053149083
<i>DDX58</i>	-2.24227525593375	-3.31975748505901	1.07748222912525	0.171202786884946
<i>EOMES</i>	-6.74520872187049	-7.43662498080301	0.691416258932523	0.319219606521539
<i>FOXP3</i>	-4.03309319387331	-5.54002883405584	1.50693564018253	0.031335852705570
<i>GATA3</i>	-2.03554087367186	-2.855360689229	0.819819815557137	0.121223701095261
<i>GZMA</i>	-3.69552171859236	-4.72243027540186	1.02690855680951	0.174970857391478
<i>GZMB</i>	-8.11127395784764	-9.32700953918235	1.21573558133471	0.197775612480429
<i>HLA-DRA</i>	-0.297058665964249	-0.616982473992716	0.319923808028467	0.546700477600114
<i>HLA-E</i>	-2.03798008209125	-2.60378507124614	0.565804989154888	0.327852923355172
<i>IDO1</i>	-3.43301436710972	-3.38600310353937	-0.0470112635703486	0.762963911970386
<i>IFNG</i>	-5.31576816159031	-7.127124431956	1.8113562703657	0.040338434220975
<i>IL10</i>	-5.80911810011223	-7.43954618335848	1.63042808324625	0.030323262746991
<i>IRF1</i>	-0.47893900216517	-1.262113206815	0.783174204649835	0.046501987101687
<i>IRF3</i>	-2.55666461748214	-3.21078882059684	0.654124203114693	0.389334355713001
<i>IRF7</i>	-1.4359558752497	-2.04829825635248	0.612342381102776	0.143223613248064
<i>LAG3</i>	-2.96478339130857	-4.7510924677141	1.78630907640553	0.016118863645100
<i>MAVS</i>	-0.476263918651671	-0.911305159895754	0.435041241244083	0.332776724290741
<i>NGG7</i>	-2.46112467320763	-3.67081946472603	1.2096947915184	0.04172342400228
<i>PDCD1</i>	-9.02858015305446	-9.07371083994141	0.0451306868869423	0.963312674333059
<i>PRF1</i>	-6.4114737460826	-7.48414373239393	1.07266998631133	0.165799863942854

---

<i><b>PTPRC</b></i>	1.9241281738128	0.933785557689449	0.990342616123356	0.034942717489808
<i><b>STAT1</b></i>	1.83787246877158	0.9520164778381	0.88585599093348	0.070223606145645
<i><b>TBX21</b></i>	-8.88551124491482	-9.15596888804419	0.270457643129374	0.822397406019161
<i><b>TGFBI</b></i>	2.77844655082342	2.12463914931126	0.653807401512164	0.089035395602203
<i><b>TIGIT</b></i>	-2.00902778606486	-3.09300121922105	1.08397343315619	0.077441499030704
<i><b>TMEM173</b></i>	-4.26158026203459	-4.62547047545213	0.36389021341754	0.561202057783847
<i><b>TNF</b></i>	-7.22199609582899	-7.78535951498227	0.563363419153275	0.432331369453729

---

Tabela da Expressão gênica em respondedores e não-respondedores em CPCNP. Comparação do poder de predição da expressão gênica em respondedores e não-respondedores por regressão logística.

<b>Gene</b>	<b>auc</b>	<b>p</b>
<i>CCL19</i>	0.533492822966507	0.668634253884685
<i>CCL2</i>	0.504784688995215	0.872523256569762
<i>CCL21</i>	0.593301435406699	0.732135745856719
<i>CCL3</i>	0.772727272727273	0.212551058139215
<i>CCL4</i>	0.69377990430622	0.423077172320021
<i>CCL5</i>	0.732057416267943	0.0667391624771409
<i>CD247</i>	0.490430622009569	0.721005332916893
<i>CD274</i>	0.679425837320574	0.1618497239449
<i>CD3D</i>	0.686602870813397	0.18347994780828
<i>CD8A</i>	0.705741626794258	0.0803623358540671
<i>CXCL10</i>	0.638755980861244	0.201791057702798
<i>CXCL11</i>	0.562200956937799	0.529522694539614
<i>CXCL13</i>	0.660287081339713	0.200135363683129
<i>CXCL9</i>	0.722488038277512	0.0610649060298294
<i>CXCR6</i>	0.511961722488038	0.96445228433961
<i>DDX58</i>	0.655502392344498	0.104193032261702
<i>EOMES</i>	0.61244019138756	0.361311815496235
<i>FOXP3</i>	0.741626794258373	0.112312256347771
<i>GATA3</i>	0.674641148325359	0.144250387090208
<i>GZMA</i>	0.65311004784689	0.298787336895152
<i>GZMB</i>	0.636363636363636	0.18690465681175
<i>HLA-DRA</i>	0.430622009569378	0.418685337086611
<i>HLA-E</i>	0.61244019138756	0.313525883451791
<i>IDO1</i>	0.464114832535885	0.967953813802546
<i>IFNG</i>	0.727272727272727	0.107037426703892
<i>IL10</i>	0.741626794258373	0.0631622094312077
<i>IRF1</i>	0.722488038277512	0.0672034122644594
<i>IRF3</i>	0.598086124401914	0.268726389470792
<i>IRF7</i>	0.665071770334928	0.100664444756055
<i>LAG3</i>	0.76555023923445	0.0441907488532611
<i>MAVS</i>	0.610047846889952	0.322237994935218
<i>NKG7</i>	0.727272727272727	0.109577530574324
<i>PDCD1</i>	0.507177033492823	0.911622843121628
<i>PRF1</i>	0.655502392344498	0.166456757538686
<i>PTPRC</i>	0.736842105263158	0.0530034411078543

---

<i>STAT1</i>	0.703349282296651	0.0729692609483211
<i>TBX21</i>	0.526315789473684	0.481277272885826
<i>TGFB1</i>	0.691387559808612	0.132443232109084
<i>TIGIT</i>	0.698564593301435	0.099671285141725
<i>TMEM173</i>	0.566985645933014	0.358210226267728
<i>TNF</i>	0.588516746411483	0.419257191260915

---

Tabela da Expressão gênica em respondedores e não-respondedores em melanoma. Comparação da expressão gênica em respondedores e não-respondedores por teste de Wilcoxon-Mann-Whitney bicaudal.

<b>Gene</b>	<b>mean.R</b>	<b>mean.NR</b>	<b>log2fc</b>	<b>p</b>
<i>CCL19</i>	-2.97844667383366	-4.72689102181789	1.74844434798423	0.0709470260557146
<i>CCL2</i>	-6.93994414868718	-7.34125930298739	0.401315154300209	0.445394771561154
<i>CCL21</i>	-5.88188985821569	-8.04850436546609	2.1666145072504	0.0369197220230165
<i>CCL3</i>	-1.23077033597003	-1.92314215839117	0.692371822421143	0.228081038831973
<i>CCL4</i>	-6.1709774438377	-6.86223468553017	0.69125724169248	0.218176948766862
<i>CCL5</i>	0.366736911510916	-0.876492027894891	1.24322893940581	0.0828555684885631
<i>CD247</i>	-7.2503436301901	-8.56388266861554	1.31353903842544	0.026018756613028
<i>CD274</i>	-7.13821687512563	-7.59356393133653	0.455347056210904	0.367129505917803
<i>CD3D</i>	-7.54654839828357	-8.94734897314131	1.40080057485774	0.0281976429919227
<i>CD8A</i>	-3.02056270120281	-4.04600331054259	1.02544060933978	0.119556100852455
<i>CXCL10</i>	-6.71848526572925	-6.90916645435338	0.190681188624131	0.91706397904992
<i>CXCL11</i>	-4.59689728308697	-5.97598643620718	1.3790891531202	0.186826490139566
<i>CXCL13</i>	-7.22058143856869	-8.13932836379782	0.918746925229132	0.31374839698676
<i>CXCL9</i>	-1.06142003336142	-1.6564341278337	0.59501409447228	0.681187071635823
<i>CXCR6</i>	-9.28680645697186	-9.47344468509981	0.186638228127949	0.94374404692675
<i>DDX58</i>	-5.73455923709465	-5.72505264126493	-0.009506595829726	0.656218691801244
<i>EOMES</i>	-7.7288552127002	-7.83651991578925	0.10766470308905	0.862111005656425
<i>FOXP3</i>	-7.41247256613768	-8.12030653650587	0.707833970368188	0.175823772967481
<i>GATA3</i>	-5.53728571282831	-6.25249754837938	0.715211835551073	0.43508589801984
<i>GZMA</i>	-6.06797708261435	-6.71442669464193	0.646449612027582	0.270988700276393
<i>GZMB</i>	-9.29307108825137	-9.76777526662266	0.474704178371294	0.106844934808651
<i>HLA-DRA</i>	-2.26969814511625	-3.72724426003211	1.45754611491587	0.119556100852455
<i>HLA-E</i>	-3.95228330918652	-4.10023526467623	0.147951955489714	0.972329288296954
<i>IDO1</i>	-5.72556985202026	-6.46868471780405	0.743114865783793	0.424985329851373
<i>IFNG</i>	-7.00608110725888	-7.77145931655336	0.765378209294481	0.433145998258907
<i>IL10</i>	-7.76741914526934	-8.30502087401287	0.537601728743537	0.424311966146206
<i>IRF1</i>	-3.75678164507227	-3.77314981721792	0.0163681721456523	0.891145260990343
<i>IRF3</i>	-4.88817181864544	-5.39847344431372	0.51030162566828	0.741757417154099
<i>IRF7</i>	-5.21160600071331	-4.90758662714638	-0.304019373566938	0.286413723447057
<i>LAG3</i>	-6.11460271218303	-6.80452290901548	0.689920196832459	0.181595131995842
<i>MAVS</i>	-2.63692185207825	-2.67385495537207	0.0369331032938138	0.930874892345128
<i>NKG7</i>	-4.86892778240029	-6.38312712649467	1.51419934409438	0.0301772899560225
<i>PDCD1</i>	-9.69716284579154	-9.83115189324552	0.133989047453987	0.555951793579603
<i>PRF1</i>	-7.9279961457829	-8.66212912886607	0.734132983083165	0.193032732567656
<i>PTPRC</i>	-0.380552196383311	-1.5943502829	1.21379808651669	0.135818965051947

---

<b><i>STAT1</i></b>	-0.891564962740032	-1.12558156681866	0.234016604078632	0.631618448796992
<b><i>TBX21</i></b>	-9.35901597914929	-9.69525218696506	0.336236207815768	0.452465750158738
<b><i>TGFB1</i></b>	-0.186131655944436	-0.738668819365811	0.552537163421376	0.26700524867301
<b><i>TIGIT</i></b>	-4.72916997547905	-5.91229323911106	1.18312326363201	0.11057717951971
<b><i>TMEM173</i></b>	-7.18877872375076	-7.06001588577221	-0.12876283797855	0.741738387709274
<b><i>TNF</i></b>	-8.68737510770877	-8.7707236194043	0.0833485116955295	0.916585676310284

---

Tabela da expressão gênica em respondedores e não-respondedores em melanoma. Comparação do poder de predição da expressão gênica em respondedores e não-respondedores por regressão logística.

<b>Gene</b>	<b>auc</b>	<b>p</b>
<i>CCL19</i>	0.684210526315789	0.0932620915349852
<i>CCL2</i>	0.578947368421053	0.418046061185571
<i>CCL21</i>	0.712280701754386	0.0290154410462909
<i>CCL3</i>	0.624561403508772	0.320544547438157
<i>CCL4</i>	0.626315789473684	0.295444767218546
<i>CCL5</i>	0.67719298245614	0.0600268190974764
<i>CD247</i>	0.726315789473684	0.0286053310266561
<i>CD274</i>	0.592982456140351	0.368688938359127
<i>CD3D</i>	0.72280701754386	0.0246757809249664
<i>CD8A</i>	0.659649122807017	0.0968816055384343
<i>CXCL10</i>	0.487719298245614	0.777927185490673
<i>CXCL11</i>	0.635087719298246	0.129480333004995
<i>CXCL13</i>	0.603508771929825	0.175804317271392
<i>CXCL9</i>	0.456140350877193	0.453832993148873
<i>CXCR6</i>	0.508771929824561	0.45583398535088
<i>DDX58</i>	0.547368421052632	0.982578871239816
<i>EOMES</i>	0.519298245614035	0.820697001215568
<i>FOXP3</i>	0.63859649122807	0.16486859325423
<i>GATA3</i>	0.580701754385965	0.347725245695143
<i>GZMA</i>	0.614035087719298	0.244903665872718
<i>GZMB</i>	0.647368421052632	0.0821218004194053
<i>HLA-DRA</i>	0.659649122807017	0.0878316696560812
<i>HLA-E</i>	0.505263157894737	0.73587287279421
<i>IDO1</i>	0.417543859649123	0.300843432582197
<i>IFNG</i>	0.580701754385965	0.294669247931735
<i>IL10</i>	0.582456140350877	0.253221280014933
<i>IRF1</i>	0.51578947368421	0.970092992339462
<i>IRF3</i>	0.464912280701754	0.268821747199175
<i>IRF7</i>	0.610526315789474	0.565600098280699
<i>LAG3</i>	0.636842105263158	0.245822483444386
<i>MAVS</i>	0.510526315789474	0.890710549786342
<i>NKG7</i>	0.719298245614035	0.0283719765918027
<i>PDCD1</i>	0.552631578947368	0.42481512933585
<i>PRF1</i>	0.633333333333333	0.163129568414277
<i>PTPRC</i>	0.652631578947368	0.0683876926072843

---

<i><b>STAT1</b></i>	0.449122807017544	0.565304744054968
<i><b>TBX21</b></i>	0.433333333333333	0.22374194829619
<i><b>TGFB1</b></i>	0.614035087719298	0.222832014825134
<i><b>TIGIT</b></i>	0.663157894736842	0.0934541490990594
<i><b>TMEM173</b></i>	0.535087719298246	0.651278110393858
<i><b>TNF</b></i>	0.512280701754386	0.821518731607403

---