

**MECANISMOS IMUNES E BIOMARCADORES
SISTÊMICOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DE
EVENTOS ADVERSOS IMUNOMEDIADOS EM
PACIENTES COM CÂNCER TRATADOS COM
IMUNOTERAPIA**

GUILHERME FERREIRA DE BRITTO EVANGELISTA

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Kenneth John Gollob

Co-orientadora: Dra. Amanda Braga de Figueiredo

São Paulo

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Evangelista, Guilherme Ferreira de Britto.

Mecanismos imunes e biomarcadores sistêmicos associados ao desenvolvimento de eventos adversos imunomediados em pacientes com câncer tratados com imunoterapia / Guilherme Ferreira de Britto Evangelista. – São Paulo, 2022.

102f.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Kenneth John Gollob

1. Imunoterapia. 2. Toxicidade. 3. Biomarcadores.

CDU 616

*Todo grande sonho começa com um sonhador.
Lembre-se sempre, você tem dentro de você a força,
a paciência e a paixão para alcançar as estrelas para
mudar o mundo.*

Harriet Tubman

Dedico este trabalho aos meus familiares e em especial à minha avó Maria Nelita, por sempre terem acreditado, apoiado e me incentivado ao longo dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e à Nossa Senhora Aparecida por todo o zelo, sabedoria e fortaleza que me proporcionaram ao longo de todo o processo.

Ao meu orientador Dr. Kenneth John Gollob e co-orientadora Dr^a Amanda Braga de Figueiredo por todo o conhecimento compartilhado, ensinamentos adquiridos e especialmente por toda a confiança que depositaram em mim ao longo desse período trabalhando juntos. Durante todos esses anos pude conviver com dois profissionais éticos, conscientes, empáticos e quem com certeza muito me inspiro.

Aos meus familiares, especialmente meus pais José do Carmo e Marli Magda, por todo o incentivo, conselhos e abdições que se fizeram necessárias para que eu atingisse essa conquista. Com certeza, grande parte do cientista, profissional e ser humano que tenho me tornado é fruto de grandes exemplos que tenho desde sempre.

Aos meus colegas de trabalho, especialmente Ananda e Nayane, por sempre estarem ao meu lado desde os experimentos até a escrita e discussão de resultados, nos momentos de alegria e naqueles mais difíceis que, como sabemos, foram muitos nesse último ano. Trabalhar com vocês é uma honra e poder contar e compartilhar momentos não só profissionais é de grande estima.

Agradeço também aos meus amigos que, em sua maioria, mesmo distantes, se fizeram presentes e acompanharam todo o processo sempre me estimulando e me amparando. Mariana P., Matheus O., Rafaella B., Marina N., Aline K. e Victória F. saibam que poder contar com amizades como vocês é inestimável e a prova de que mesmo com a distância alguns vínculos são inquebráveis.

Por fim, agradeço aos demais integrantes do Grupo de Imuno-Oncologia Translacional e profissionais do A.C Camargo Cancer Center – Kátia, Clara, Larissa, Dr. Milton e Dr. Caio - por toda colaboração e parceria desenvolvidas nos últimos anos e agradeço também à instituição por toda infraestrutura e oportunidades oferecidas.

RESUMO

Evangelista GFB. **Mecanismos imunes e biomarcadores sistêmicos associados ao desenvolvimento de eventos adversos imunomediados em pacientes com câncer tratados com imunoterapia** [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2022.

INTRODUÇÃO: O desenvolvimento de eventos adversos imunomediados (irAEs) tem ganhado destaque dado o aumento de sua incidência decorrente da maior aplicabilidade da imunoterapia com inibidores de *checkpoints* imunológicos. Esse quadro envolve inflamações extratumorais decorrentes da ativação do sistema imune de pacientes em imunoterapia. No entanto, atualmente carecem de biomarcadores ou vias imunológicas capazes de prever o seu desenvolvimento e/ou contribuir em um manejo específico. **OBJETIVO:** Identificar possíveis biomarcadores e mecanismos imunes responsáveis pelo desenvolvimento de irAEs em pacientes tratados com ICI. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Incluímos 48 pacientes diagnosticados com melanoma (n=23) ou câncer de pulmão de células não-pequenas (CPNPC) (n=25) candidatos à imunoterapia em primeira linha. Esses foram graduados, ao longo do tratamento, conforme o grau de toxicidade (Graus 0 a 5) e agrupados em *No/Mild* (G0-G2, n=39) e *Severe* (G3-G4, n=9). Mediante coleta de sangue periférico no momento anterior ao início da imunoterapia, foi possível a caracterização de populações imunes celulares por citometria de fluxo multiparamétrica (FACSymphony A5, BD Bioscience) e dosagem de analitos solúveis por ensaio multiplex (Plataforma Luminex). **RESULTADOS:** Na coorte de melanoma, identificamos que pacientes *Severe* apresentam um aumento na frequência da população de linfócitos T CD4 efetores CXCR3+, sendo esse um candidato a biomarcador de toxicidade imunomediada grave em melanoma (AUC:0,90). Na coorte de CPNPC evidenciamos uma balança citotóxica/inflamatória e imunorreguladora, de modo que pacientes *Severe* tem maior frequência celular de perfil citotóxico, CD8 efetora GzB+, e *No/Mild* maior frequência de CD4 total. Em conjunto esses parâmetros têm bom poder de predição (AUC:0,88). Em uma análise com ambos os tumores, identificamos maior expressão intracelular ou solúvel de moléculas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-18:IL-10) que configuram bons candidatos a biomarcadores, e sugerem, em conjunto com os resultados tumor-específicos, uma sinergia entre as vias imunológicas de IFN- γ e TNF- α . **CONCLUSÃO:** Pacientes com irAEs graves apresentam características pró-inflamatórias anteriormente ao início do uso de ICI, podendo as vias e marcadores serem alvos candidatos a biomarcadores ou empregados como manejo clínico.

Palavras-chave: imunoterapia; toxicidade; evento adverso; biomarcadores; via imunológica.

ABSTRACT

Evangelista GFB. **Immune mechanisms and systemic biomarkers associated to immune-related adverse events in patients treated with immunotherapy** [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2022.

INTRODUCTION: Immune-related adverse events (irAEs) development has attracted attention given the increase in its incidence due to the greater administration of immune checkpoint inhibitors (ICI) immunotherapy. The adverse events are characterized as an extratumoral inflammation resulting from the activation of the immune system in patients undergoing immunotherapy. However, currently, there is no biomarkers or immunological pathways capable of predicting their development and/or contributing to an earlier management. **OBJECTIVE:** Identify possible biomarkers and immune mechanisms involved in irAEs development in patients treated with ICI. **MATERIALS AND METHODS:** 48 patients diagnosed with melanoma (n=23) or non-small cell lung cancer (NSCLC) (n=25) candidates to first-line immunotherapy were included. Patients were graded along treatment according to the toxicity degree (Grades 0 to 5) and grouped into No/Mild (G0-G2, n=39) and Severe (G3-G4, n=9). After a *baseline* blood collection, we characterize immune populations by multiparametric flow cytometry (FACSymphony A5, BD Bioscience) and dosage of soluble analytes by multiplex assay (Luminex Platform). **RESULTS:** In the melanoma cohort, we identified increased frequency of effector CD4 T cells CXCR3⁺ in Severe patients which could be a candidate biomarker of irAEs development (AUC: 0.90). In NSCLC group, we highlighted a cytotoxic/inflammatory and immunoregulatory balance. Severe patients had increased levels of cytotoxic parameters, effector CD8 Granzyme B⁺ cells for example, and No/Mild an increase of total CD4 T cells, which together have a good predictive power (AUC: 0.88). Finally, when analyzed both tumors we identified higher intracellular or soluble expression of pro-inflammatory molecules (IFN- γ , TNF- α , and IL-18:IL-10) that configure good biomarker candidates, and mainly suggest, in addition to tumor-specific results, a synergy between IFN- γ and TNF- α pathways. **CONCLUSION:** Severe irAEs patients exhibit pro-inflammatory features prior to initiation of ICI use, and the pathway and markers may be candidate targets for clinical management.

Keywords: immunotherapy; toxicity; adverse events; biomarkers; immunological pathways

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estimativa 2020. Incidência nacional estimada dos tipos de câncer segregada por sexo	1
Figura 2	The Hallmarks of Cancer: New Dimensions (2022)	3
Figura 3	Teoria da Imunoedição	5
Figura 4	Imunoterapia com inibidores de checkpoints imunológicos	10
Figura 5	Fisiopatologia dos eventos adversos imunomediados	16
Figura 6	Desenho experimental	19
Figura 7	Anticorpos - Citometria de Fluxo	22
Figura 8	Análise direcionada – PBMC	24
Figura 9	Tempo de desenvolvimento de toxicidade aos inibidores de checkpoints	29
Figura 10	CXCR3 como importante marcador em pacientes <i>Severe</i> em melanoma	31
Figura 11	Caracterização de subpopulação Th1 em melanoma	33
Figura 12	Eixo CXCR3 identificado na coorte de melanoma	34
Figura 13	Dosagem dos ligantes de CXCR3 no plasma da coorte de melanoma	35
Figura 14	Curva ROC referente à regressão logística univariada de $CD4_{eff} CXCR3+$ em melanoma	36

Figura 15	Caracterização de populações citotóxicas diferencialmente expressas no UMAP de CPNPC	38
Figura 16	Expressão diferencial de Granzima B nas populações imunes em CPNPC	40
Figura 17	Parâmetros imunoreguladores restritos a pacientes <i>No/Mild</i> em CPNPC	41
Figura 18	Compartimento mielóide indica perfil pró-inflamatório em Severe	42
Figura 19	Modelos multivariados para predição de irAEs em CPNPC	44
Figura 20	Análises não supervisionada dos dados de citometria na coorte combinada	46
Figura 21	Rede de interação dos marcadores de ativação e supressão e sua expressão diferencial em ambos os tumores	48
Figura 22	Expressão de marcadores de ativação em linfócitos T na coorte conjunta	49
Figura 23	Expressão dos marcadores de ativação em linfócitos T CD4 e CD8 totais e efetores	50
Figura 24	Dosagem de analitos solúveis e perfil imune solúvel do desenvolvimento de irAEs.....	51
Figura 25	Razões inflamatórias desempenham papel no estabelecimento de irAEs graves.....	52
Figura 26	Forest plot referente às regressões logísticas univariadas em ambos os tumores.....	53
Figura 27	TCR $\alpha\beta$ TNF- α + e razão IL-18: IL-10 como modelo de predição de irAEs em ambos os tumores	54

Figura 28	Rede imunológica envolvida no desenvolvimento de irAEs grave capaz de ser detectada anteriormente ao início da imunoterapia	55
Figura 29	Modelo sugerido da sinergia IFN- γ /TNF- α no contexto do desenvolvimento de irAEs e possíveis alvos terapêuticos	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos pacientes	28
Tabela 2 - Distribuição dos eventos adversos imunomediados	29
Tabela 3 – Análises univariadas das populações imunes e citocina em CPNPC	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células Apresentadoras de Antígeno
AUC	Área Abaixo da Curva (do inglês <i>area under curve</i>)
BID	do inglês <i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BRAF	Homólogo B1 do oncogene viral de sarcoma murinho v-raf
CCR	do inglês <i>C-C chemokine receptor</i>
CD	Grupamento de Diferenciação (do inglês Cluster of differentiation)
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CPNPC	Câncer de pulmão de células não-pequenas
CTACK	Quimiocina atrativa de linfócitos T para pele
CTL	Linfócito T Citotóxico
CTLA-4	Proteína 4 Associada ao Linfócito T citotóxico
CXCL	do inglês <i>Chemokine C-X-C motif ligand</i>
CXCR3	do inglês <i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 3</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos
GRO-α	Oncogene regulador de crescimento - alfa
gtBid	forma truncada de BID
GzB	Granzima B
HER2	Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
IC	Intervalo de confiança
ICI	Inibidores de <i>checkpoints</i> imunológicos
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN	Interferon
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP-10	Proteína 10 induzida por interferon

ITAC	Quimiocina α induzida por interferon
kg	quilograma
LIF	Fator inibidor de linfócitos
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MCP	Proteína quimoatraente de monócito
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MDSC	Células supressoras de origem mieloides
mg	miligrama
MHC	Molécula do Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIF	Fator de inibição de macrófagos
MIG	Monocina induzida por interferon gama
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
ml	mililitros
NFκB	Fator de transcrição kappa B
NGF	Fator de Crescimento Neural
NK	Células assassina natural (do inglês <i>natural killer</i>)
NSCLC	do inglês non-small cell lung cancer
OR	do inglês <i>Odds Ratio</i>
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PD-L1	Ligante da proteína de morte celular programada 1
pg	picograma
QT	Quimioterapia
RANTES	do inglês <i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i>
Rb	Retinoblastoma (gene)
SCF	Fator de Célula-Tronco
SCGF	Fator de crescimento de células-tronco
SDF	Fator derivado do estroma
STAT	transdutor de sinal e ativador da família das proteínas de transcrição
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCR	Receptor de células T
TGF	Fator de crescimento e transformação
Th	Linfócito T auxiliar (do inglês <i>T helper</i>)

TNF	Fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
Treg	Linfócitos T regulador
UMAP	do inglês <i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
κ	Kappa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Epidemiologia do câncer.....	1
1.2. Carcinogênese.....	2
1.3. Imunoedição.....	4
1.4. Imunoterapia.....	7
1.5. Eventos adversos imunomediados (irAEs)	12
2. HIPÓTESE	18
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivos gerais	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. Recrutamento de pacientes	20
4.2. Avaliação do desenvolvimento de eventos adversos	20
4.3. Processamento de amostras	21
4.4. Avaliação de populações imunes celulares por citometria de fluxo multiparamétrica .	21
4.4.1. Análises de dados citometria de fluxo multiparamétrica.....	22
4.5. Avaliação de citocinas e quimiocinas solúvel	25
4.6. Análise dos resultados	25
5. RESULTADOS	27
5.1. Características clínicas dos pacientes	27
5.2. Linfócitos T CD4 de possível perfil Th1 podem desempenhar importante papel no desenvolvimento de irAEs em pacientes com melanoma	30
5.3. Balança imune composta por populações imunes pró-inflamatórias e citotóxicas anterior ao início da terapia com ICI direciona o desenvolvimento de irAEs graves em CPNPC.....	37

5.4. Vias imunológicas envolvendo TNF- α e IFN- γ são associadas ao desenvolvimento de irAEs grave, em ambos os tumores, anteriormente ao início da imunoterapia com inibidores de checkpoints	45
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÃO	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXO	
Anexo I Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia do câncer

O câncer compreende um grupo de doenças de caráter fundamentalmente genético cujo processo – carcinogênese – envolve múltiplas etapas que culminam no estabelecimento de células malignas cujas características diferem daquelas do tecido do qual originaram¹.

Segundo o *Global Cancer Observatory (International Agency for Research on Cancer)*, no ano de 2020 houve 19,3 milhões de novos casos de câncer ao longo do mundo e 9,96 milhões de morte por essa doença, sendo que para os próximos vinte anos, as estimativas apontam um aumento em 47% de novos casos em relação a 2020 e um total de aproximadamente 16,3 milhões de mortes. Dentre os tumores de maior incidência se destacaram os cânceres de mama feminino (11,7%), pulmão (11,4%) e colorretal (10%). O melanoma, por sua vez, mesmo que pouco incidente (1% dentre os tumores de pele) apresenta alta letalidade dentre tumores cutâneos (75%)^{2,3}.

No Brasil, as estatísticas e estudos epidemiológicos do câncer são realizados pelo Instituto Nacional do Câncer-INCA, cuja última estimativa foi realizada no ano de 2020. Nesse estudo, são previstos para cada ano do triênio (2020-2022) cerca de 625 mil novos casos de câncer, sendo os mais incidentes o câncer de pele não melanoma, mama e próstata, cólon e reto, pulmão e estômago⁴.

Para o ano de 2020, quando avaliado separadamente por sexo, o tumor mais recorrente entre homens é o de próstata seguido de cólon e reto e traqueia, brônquio e pulmão, enquanto entre mulheres o câncer de mama foi seguido de câncer de cólon e reto e colo de útero como os mais frequentes (Figura 1).

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Próstata	65.840	29,2%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Colo do útero	16.590	7,4%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Estômago	13.360	5,9%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Estômago	7.870	3,5%
Esôfago	8.690	3,9%			Ovário	6.650	3,0%
Bexiga	7.590	3,4%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Laringe	6.470	2,9%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%
Leucemias	5.920	2,6%					

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2019⁴

Figura 1 - Estimativa 2020. Incidência nacional estimada dos tipos de câncer segregada por sexo

Diante das estimativas e perspectivas quanto à incidência de tumores ao longo dos próximos anos, diversas áreas da ciência buscam compreender a complexidade do câncer e traçar estratégias terapêuticas cada vez mais específicas e eficientes.

1.2. Carcinogênese

Bishop e Weinberg (1996) descreveram a sequência de eventos e alterações que as células de um tecido deveriam sofrer para que o tumor se estabelecesse⁵. Ao longo desse processo, apontaram para a importância dos genes de controle de ciclo celular, divididos, principalmente, em dois grandes grupos: os supressores de tumor e oncogenes.

Segundo a hipótese do *double-hit*, para o desenvolvimento do câncer é necessária a mutação de perda de função em ambos alelos de genes supressores tumorais (gene Rb, por exemplo). Uma vez que desempenham papel crucial no controle da divisão celular, reparo do DNA e sinalização para apoptose, a perda de função desses genes leva a uma desregulação fisiológica e a processos de proliferação e desenvolvimento celular aberrantes⁶. Por outro lado, os oncogenes (HER2, por exemplo) são advindos da ativação de proto-oncogenes que, quando sofrem mutações de ganho de função, contribuem para um crescimento e divisão celular acelerados e descontrolados por meio ou de uma maior atividade do gene ou por uma ativação constitutiva⁷.

Reunindo todos os achados científicos dessa década, Hanahan e Weinberg (2000) publicaram a primeira versão do clássico “*Hallmarks of Cancer*”. Nessa revisão, guiados principalmente pela ideia de quantas vias reguladoras seriam necessárias para uma célula adquirir potencial maligno, estabeleceram seis alterações essenciais na fisiologia celular⁸.

Dentre essas alterações destacava-se a capacidade de autossuficiência celular no que diz respeito aos sinais de crescimento atrelado ao escape de vias de apoptose e sinais de inibição do crescimento, garantindo a proliferação anormal dessas células alteradas. Além dessas características, a manutenção de processo angiogênico perpetua o crescimento tumoral, como uma importante fonte nutricional, e viabiliza o processo de migração das células tumorais do sítio primário a outros locais, no fenômeno denominado metástase⁸.

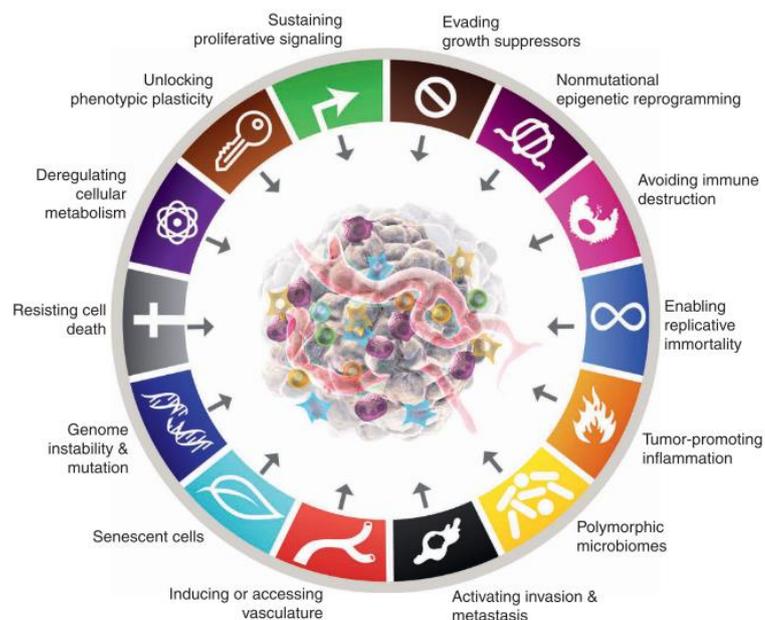
Durante o processo de malignização da célula até o estabelecimento do tumor, as vias afetadas e os processos envolvendo os *hallmarks* são altamente variáveis dentre os diferentes tipos tumorais e, até mesmo entre tumores de mesma origem.

Ao longo da década seguinte e com o avanço da ciência incluindo várias áreas do conhecimento científico, novos conhecimentos do processo de tumorigênese foram adquiridos,

levando Hanahan e Weinberg a adicionarem, em 2011, outras quatro novas características aos *Hallmarks of Cancer*.

Nessa nova revisão, além de atualizarem as alterações fisiológicas propostas no artigo de 2000, incluíram-se as características de instabilidades e mutações genômicas, alterações no metabolismo energético celular e dois aspectos de cunho imunológico: a capacidade do tumor em gerar um quadro inflamatório, bem como sua característica de evadir-se do sistema imune, e essa última característica impede sua destruição, afetando diretamente a agressividade e malignidade do câncer⁹.

Recentemente, Hanahan (2022) divulgou atualização dos *Hallmarks of cancer* à luz dos avanços científicos da última década. Nessa nova versão, compreendendo a importância do microambiente tumoral como um todo na modulação do tumor, foram adicionados quatro novos mecanismos (Figura 2). 1) desbloqueio da plasticidade fenotípica – garantindo ao tumor escapar de diferenciação terminal e se mantendo em constante expansão e proliferação; 2) reprogramação epigenética – alterações genéticas envolvendo remodelamento de cromatina e de histonas; 3) polimorfismo do microbioma – microrganismos, bactérias e fungos capazes de modular o tumor ao promover, por exemplo, seu crescimento, gerando inflamação e até resistência a terapias; 4) senescência celular – células senescentes tumorais e/ou estromais presentes no microambiente tumoral e capazes de atuarem na malignização tumoral¹⁰.



Fonte: Retirado de Hanahan, 2022¹⁰

Figura 2 - The Hallmarks of Cancer: New Dimensions (2022).

1.3. Imunoedição

No ano de 1957, Burnet e Thomas publicaram a hipótese da vigilância imunológica, na qual apontam a função do sistema imune em eliminar células neoplásicas e garantir a homeostase tecidual¹¹. Essa vigilância se daria pelo reconhecimento de antígenos específicos das células tumorais, sendo, muitas vezes, produtos de mutações que resultam em proteínas aberrantes e, portanto, passíveis de reconhecimento principalmente pelas células T^{12,13}.

Nos anos seguintes, a hipótese da vigilância imunológica acabou caindo em desuso, até que entre as décadas de 70 e 90, com a descoberta das células *natural killers* (NK) se postulou sua participação na imunovigilância¹⁴ e diversos estudos voltaram a ser realizados em torno dessa teoria descrita anteriormente por Burnet. A partir dessa descoberta, aprofundaram-se os conhecimentos na relação tumor-sistema imune, de tal forma que se estabeleceu a ação direta do sistema imune, mais especificamente do microambiente imunológico, no desenvolvimento de tumores.

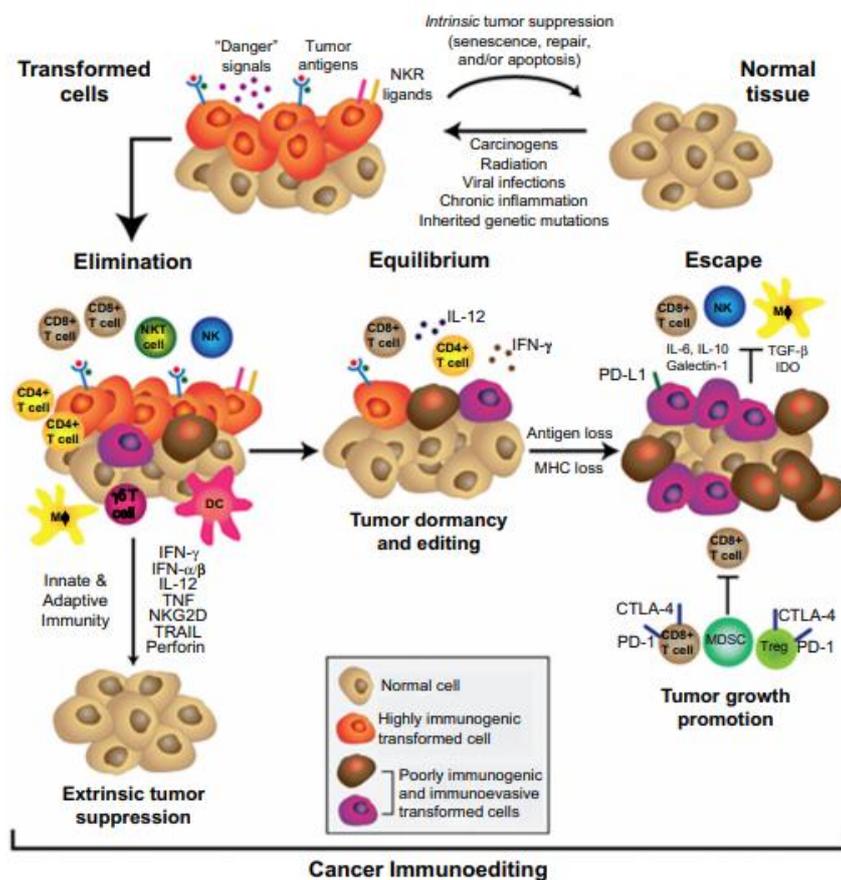
Reunindo os estudos anteriores, principalmente os de Burnet e Thomas, Dunn *et. al* (2002) oficializou a Teoria da Imunoedição, que envolve tanto aspectos da imunovigilância quanto do processo de escape tumoral, atribuindo ao sistema imune não só a capacidade de eliminação do tumor, mas, também, de perpetuação de clones tumorais menos imunogênicos e, portanto, menos suscetíveis às ações de células imunes efectoras¹⁵.

A imunoedição compreende, portanto, três fases, didaticamente separadas em eliminação, equilíbrio e escape¹⁵⁻¹⁷ (Figura 3). Essas fases, normalmente apresentadas de maneira linear, ocorrem do ponto de vista imunológico concomitantemente, havendo grande interação entre as células e moléculas produzidas. A **fase de eliminação** envolve os principais conceitos da imunovigilância e reúne componentes tanto da imunidade inata quanto da imunidade adaptativa para eliminar as células transformadas. Essa fase foi esclarecida com uma série de experimentos em modelo animal com depleção de diversos constituintes chaves da resposta imune, como células NK, linfócitos T e também citocinas como IFN- γ e IL-12 que, quando depletados, aumentavam a suscetibilidade a diversos tipos tumorais.^{18,19}

O microambiente tumoral e as moléculas por ele produzidas sinalizam ao sistema imune inato a presença de componentes celulares ou moléculas não reconhecidas como próprias, frente a isso células NK prontamente exercem sua função de *killing* naquelas populações celulares aberrantes. Conjuntamente ao processo de morte celular, ocorre a produção de IFN- γ , cuja via de sinalização atua no microambiente tumoral ativando células apresentadoras de antígeno (APCs) e favorecendo a montagem de respostas imunes adaptativas.

As células NK, com sua capacidade citolítica, e os macrófagos, com alta capacidade fagocítica, presentes no microambiente, são ativados para destruir as células do tumor nascente.

Os debris celulares gerados pelo processo são capturados por células apresentadoras de antígeno e direcionadas para os linfonodos onde realizam o *priming* para linfócitos T CD8+ e T CD4+. Essas APCs ativadas pela ação do IFN- γ secretam inúmeras citocinas, além de expressar moléculas co-estimuladoras que induzem, conjuntamente com o reconhecimento antigênico, a uma diferenciação de linfócitos T CD4 em perfil Th1 e linfócitos T CD8 em citotóxicos (CTL), que atuarão ativamente no *clearance* tumoral²⁰. Esses linfócitos específicos para o tumor migram para o microambiente tumoral e destroem as células anormais, impedindo que o tumor se desenvolva¹⁵.



Fonte: Retirado de Teng *et. al*, 2013²¹

Figura 3 - Teoria da Imunoedição. Constituída por três fases: eliminação, equilíbrio e escape, a teoria da imunoedição é o processo pelo qual as células neoplásicas sofrem ação do sistema imune, onde linfócitos T citotóxicos, NK, citocinas inflamatórias como IFN- γ entre outras, atuam em sinergia para eliminar o tumor (eliminação). Aqueles clones que resistem a essa ação entram em período de latência/equilíbrio e sofrem pressão constante do sistema imune adaptativo, acumulando mutações que possibilitam seu escape, quando o tumor burla o sistema imune e inicia seu processo de crescimento e estabelecimento clínico.

No entanto, ainda que o sistema imune elimine a maior parte das células neoplásicas, alguns clones resistem a esse ataque e permanecem sob pressão constante do sistema imune, o que impede o crescimento do tumor, mas força constantemente a seleção natural de clones que

acumulam cada vez mais mutações que propiciam a capacidade de resistir à eliminação pelo sistema imune, caracterizando a **fase de equilíbrio**, que é marcada por esse período de latência¹⁷.

Com o acúmulo de instabilidades genômicas e mudanças na balança de subpopulações imunes, os clones de células tumorais são capazes de escapar da ação do sistema imune iniciando a **fase de escape**, na qual o tumor utiliza de diversos mecanismos para evadir-se da ação antitumoral e iniciar seu crescimento a ponto de se tornar clinicamente identificável¹⁶. Os mecanismos pelos quais o escape acontece são variados, sendo uma interação entre as células tumorais altamente modificadas e o sistema imune do hospedeiro.

Muitos tipos tumorais são capazes de escapar do seu reconhecimento pelo sistema imune através da perda da expressão dos genes do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC), inviabilizando a apresentação para células T, ou, ainda, por defeitos na maquinaria de processamento de antígeno. Além dessas, células tumorais podem expressar uma variedade de moléculas imunossupressoras como o PD-L1 e IDO, que suprimem a ação de células efetoras como, por exemplo, CTL²².

Quando analisado o microambiente tumoral, outra forma de escape é o estabelecimento de um ambiente imunossupressor, caracterizado por grandes quantidades de citocinas imunossupressoras como IL-10 e TGF- β , de células caracteristicamente imunossupressoras, como as células T reguladoras (Treg) e as células supressoras de linhagem mieloide (MDSC), e, por fim, pela expressão de moléculas que suprimem a atividade de células T, como é o caso dos receptores inibidores, PD-1 (proteína programada 1 da morte celular; CD279) e CTLA-4 (proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico; CD152). Esse ambiente acaba por inibir diversas atividades efetoras do sistema imune inato e adaptativo, favorecendo o crescimento do tumor²³.

Diante de toda a relação estabelecida na Teoria da Imunoedição, diversas abordagens terapêuticas foram pensadas baseadas em modular componentes imunológicos, a fim de favorecer a eliminação do tumor.

1.4. Imunoterapia

Com os diversos avanços na área de imunologia de tumores e da importância do sistema imune em combater as células neoplásicas, condutas clínicas foram traçadas a fim de reestimulá-lo ou aumentar sua atividade, revolucionando, assim, a área de tratamentos oncológicos.

Anteriormente ao início do uso de imunoterápicos, as terapias antitumorais tinham ação principalmente no tumor, interrompendo o ciclo celular de células tumorais e/ou bloqueando sinais de sobrevivência (ex. quimioterapia) ou sua excisão completa ou parcial, no caso das cirurgias. Essas terapias por muitos anos foram amplamente utilizadas e apresentavam efeitos consideráveis em tumores iniciais, mas com o avanço dos estágios tumorais perdiam sua eficácia^{24,25}.

A imunoterapia possui categorias com base na linha utilizada para estimular o sistema imune. A terapia com vírus oncolíticos leva à infecção de células tumorais por vírus modificados, permitindo seu efetivo reconhecimento pelo sistema imune, estimulando-o e ativando uma resposta imune inflamatória que propicia a destruição das células transformadas e infectadas. Por outro lado, as vacinas utilizam antígenos tumorais específicos a fim de direcionar a resposta de linfócitos T ao combate tumoral. A transferência adotiva, por sua vez, envolve engenharia genética das próprias células imunes do paciente, comumente linfócitos T, que após expansão clonal *in vitro* são reinfundidas no paciente²⁶.

Por certo tempo e para alguns tipos de tumor, a aplicação da imunoterapia se iniciou com o uso de infusões de citocinas pró-inflamatórias como IFN- α e IL-2²⁷. Ambos os regimes de tratamento foram utilizados em pacientes diagnosticados com melanoma ressecáveis em estágios IIB e III e melanoma metastático, respectivamente²⁸. No entanto, tais terapias, apesar de alguns benefícios clínicos, apresentaram baixa tolerância devida à alta toxicidade, uma vez que promoviam quadro inflamatório sistêmico. Diante desses casos, seu uso acabou sendo evitado como monoterapia e estudos como terapia combinada seguem em andamento²⁶.

Nos últimos anos, a imunoterapia com uso de anticorpos monoclonais inibidores de *checkpoints* imunológicos (ICI), como anti-PD-1, anti-CTLA-4 e anti-PD-L1, vêm ganhando cada vez mais destaque na prática clínica devido aos seus resultados promissores, sendo apontados pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) como o grande avanço na terapia contra o câncer no ano de 2017²⁹. Esses bloqueadores visam bloquear os mecanismos supressores utilizados pelo tumor como forma de escape e, assim, permitem a resposta efetora de células antitumorais³⁰.

Resgatando o conceito da Teoria da Imunoedição, a imunoterapia com inibidores de *checkpoints* tem seu potencial principalmente nas características que envolvem as fases de equilíbrio e de escape, podendo levar a um quadro de resposta completa caracterizada pela eliminação do tumor ou reverter o processo de escape a um estágio anterior de equilíbrio – resposta parcial. Por outro lado, é possível ocorrer, ainda, a resistência a esses tratamentos, podendo essa ser inata, quando o tumor em fase de escape é irresponsivo ao tratamento, ou adquirida, baseada na seleção de células mais resistentes ao sistema imune¹⁷.

No ano de 2018, a Assembleia Nobel do Instituto Karolinska, concedeu com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina, os pesquisadores Tasuku Honjo e James P. Allison, pela descoberta e aplicabilidade, respectivamente, de moléculas e mecanismos chaves da imunorregulação (PD-1 e CTLA-4, respectivamente) que, posteriormente, foram empregados no desenvolvimento de novas terapias para o câncer através da inibição da regulação imune negativa. Dentre os ICI o primeiro deles aplicável clinicamente foi o anticorpo monoclonal capaz de bloquear a molécula de CTLA-4.

Durante o processo de ativação de linfócitos T, células T *naive* recebem o primeiro sinal de ativação proveniente da ligação do antígeno/MHC apresentado pelas células apresentadoras de antígeno (células dendríticas, macrófagos, entre outras) ao TCR (receptor de célula T, do inglês, *T cell receptor*). Os sinais subsequentes são provenientes da sinalização gerada por moléculas co-estimuladoras e seus ligantes, como é o caso do CD28 e seus ligantes B7.1 e B7.2 (CD80 e CD86, respectivamente), além da sinalização gerada por citocinas inflamatórias como IFN- γ e IL-12^{31,32}.

Nesse cenário, o CTLA-4 consiste num receptor presente essencialmente na superfície de células T, capaz de regular a amplitude de sinais nos estágios iniciais da ativação dessas células ao apresentar maior afinidade com os ligantes (B7.1 e B7.2) do que o CD28 e, portanto, sua expressão na superfície de linfócitos gera uma competição que favorece a inibição à ativação de linfócitos T (Figura 4)³³.

A atividade imunossupressora de CTLA-4 se dá, principalmente, pela atividade de tirosina quinases presentes na cauda citoplasmática dessa molécula que, quando sofre fosforilação, mediante a ativação do TCR, é retida na superfície celular. Uma vez fosforilada, muitas outras moléculas podem se associar à porção intracelular do CTLA-4, promovendo a redução das ativações TCR-dependentes, uma vez que age inibindo vias como da MAP quinase, ERK, NF- κ B entre outras, contribuindo, nesse caso, para a redução da produção de citocinas e parada de ciclo celular³⁴.

Ainda que seja expressa em linfócitos T CD8, a participação de CTLA-4 está fortemente associada a linfócitos T CD4, principalmente aqueles de perfil T regulador (Treg), uma vez que essas subpopulações apresentam expressão constitutiva de CTLA-4 que contribui para sua função imunossupressora³⁵.

No ano de 2002 o grupo de James Allison demonstrou, em estudo com camundongos, que o bloqueio de CTLA-4 restaurava os sinais de coestimulação e, conseqüentemente, aumentava a imunidade antitumoral, demonstrando alta capacidade não só de controlar o crescimento tumoral, mas também, garantir a eliminação completa do tumor em alguns camundongos³⁶.

Esse achado e demais pesquisas subsequentes levaram à realização de *clinical trials* envolvendo o bloqueio de CTLA-4 para tumores sólidos. Em 2010, um estudo clínico de fase III levou à aprovação do ipilimumabe (fármaco anti-CTLA-4) para o tratamento de melanoma avançado irressecável (estágios III e IV) já submetido a terapias anteriores, ao demonstrar que pacientes que receberam ipilimumabe, combinado ou não à vacina gp100, apresentaram aumento na sobrevida global³⁷. Em seguida a este estudo, outros estudos clínicos foram realizados com o objetivo de aprovar esse imunoterápico, em monoterapia ou em terapias combinadas, para outros tipos tumorais^{38,39}.

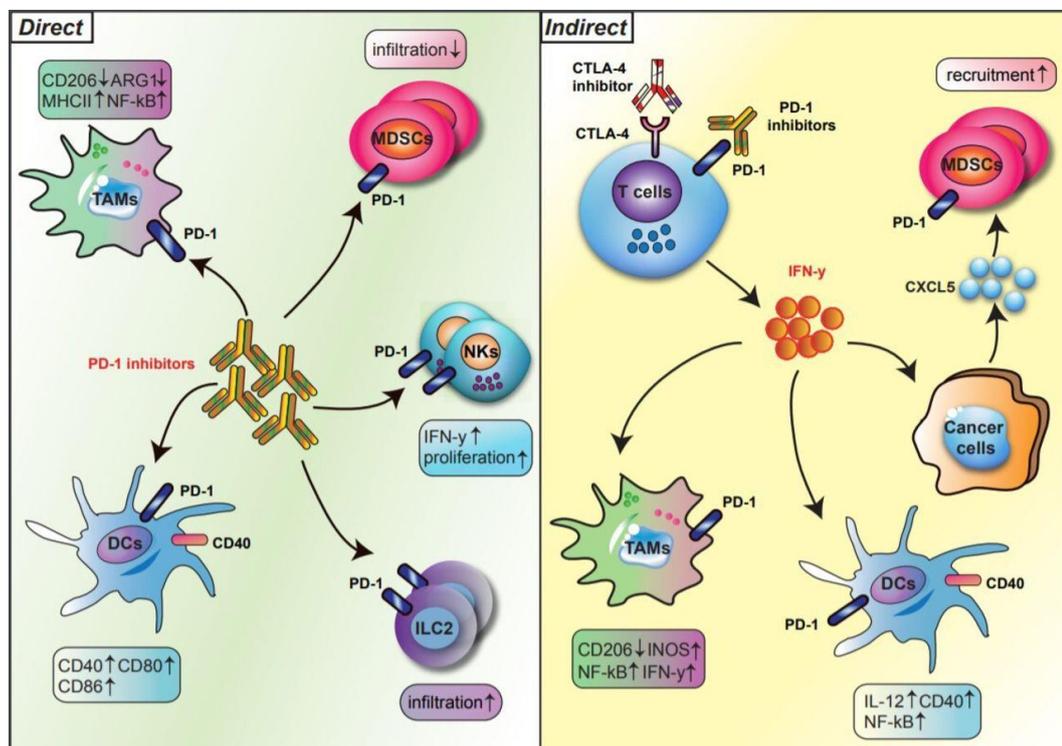
Concomitante aos estudos envolvendo o CTLA-4 como importante molécula imunorreguladora, Tasuku Honjo identificou em 1992 a molécula de PD-1⁴⁰. Tal molécula tem sua expressão induzida em linfócitos T e NK durante seu processo de ativação⁴¹ e atua no controle da atividade, principalmente citolítica, dessas células em tecidos periféricos durante o processo de inflamação, impedindo danos teciduais, limitando quadros de autoimunidade e sendo, portanto, uma importante molécula na regulação negativa da resposta imune⁴².

A molécula de PD-1 possui como ligantes o PD-L1 e o PD-L2 (CD274 e CD273, respectivamente), que são expressos em APCs e em uma variedade de tecidos⁴³, como o próprio tumor, sendo um dos possíveis mecanismos de escape. Mediante o contato PD-1-PD-L1/PD-L2, ocorre a inibição do sinal gerado pelo TCR, afetando a duração da fenda imunológica entre o linfócito T com as APCs ou com as células alvo e, conseqüentemente, impedindo a atividade efetora dessas células⁴⁴.

Intracelularmente, após a sinalização causada pelo complexo MHC/TCR, ocorre o recrutamento de fosfatases para a cauda intracelular da molécula de PD-1. Essa fosfatase é responsável, portanto, por se opor aos sinais de ativação uma vez que inibe vias como PI3K-AKT, RAS e NF- κ B, reduzindo a ativação, crescimento, proliferação, produção de citocinas e os sinais de sobrevivências⁴⁵.

Células T reguladoras expressam altas quantidades de PD-1 em sua superfície, especialmente no microambiente tumoral, tornando-o cada vez mais imunossupressor, e com linfócitos T cada vez menos eficientes⁴⁶. No microambiente tumoral, as células T residentes estão expostas repetidamente a antígenos, de tal forma que há a indução da expressão de PD-1 na superfície desses linfócitos, que ao se tornarem exaustos têm sua atividade e responsividade drasticamente reduzidas³⁵.

Diante desse cenário de depleção da atividade de células T dentro do microambiente tumoral, o bloqueio do PD-1 para o tratamento do câncer foi desenhado no intuito de tentar reverter esse estado de exaustão, limitar a imunossupressão gerada pelas Treg e perpetuar a ativação dos linfócitos num período suficiente para a eliminação tumoral (Figura 4).



Fonte: Retirado de Liu et al⁴⁷, 2020

Figura 4 – Imunoterapia com inibidores de *checkpoints* imunológicos. Fisiologicamente, tanto CTLA-4 quanto PD-1 agem na redução da atividade de linfócitos T, característica que suprime a resposta antitumoral. Frente a isso, os inibidores de *checkpoint* ao inibirem essas vias permitem a montagem de uma resposta antitumoral eficiente, baseada, sobretudo, na produção de IFN- γ , ativação de via de NF- κ B que levam ao recrutamento e polarização de populações efetoras e citotóxicas para o microambiente tumoral.

No ano de 2014, dois fármacos anti-PD-1, pembrolizumabe (Setembro, 2014) e nivolumabe (Dezembro, 2014) receberam aprovação do FDA^{48,49}. A aprovação de nivolumabe para melanoma se deu com base nos resultados referentes ao estudo clínico CheckMate-037, realizado com casos de melanoma avançado, irresecável ou metastático, pacientes que

progrediram após ipilimumabe ou em pacientes com mutação BRAF V600 após terapia alvo com inibidor de BRAF⁴⁹.

No intuito de aumentar a taxa de resposta e demais benefícios de cada um dos imunoterápicos até então aprovados seguiu-se à possibilidade de terapias combinadas tanto entre imunoterápicos - ipilimumabe e nivolumabe em melanoma metastático PD-L1 negativo⁵⁰ – quanto quimioterapia e imunoterapia – pembrolizumabe associado a quimioterapia⁵¹.

O uso de inibidores de *checkpoints* imunológicos em primeira linha se deu inicialmente em melanoma e CPNPC (câncer de pulmão de não pequenas células, do inglês, *non-small cell lung cancer* - NSCLC), que hoje têm planos terapêuticos melhor estabelecidos.

Melanoma é um tumor que se desenvolve pela malignização dos melanócitos – células especializadas na produção de melanina⁵². Para esse tumor, o CheckMate 067 demonstrou a aplicabilidade da combinação ipilimumabe (3mg/kg) e nivolumabe (1mg/kg) em pacientes diagnosticados com melanoma irressecável ou metastático sem mutação em BRAF V600⁵³.

Durante o acompanhamento desse estudo, demonstrou-se que pacientes recebendo a terapia combinada possuíam a mediana de sobrevida global de 60 meses enquanto aqueles tratados em monoterapia, seja ela com nivolumabe ou ipilimumabe possuíam valores menores, 36,9 meses e 19,9 meses, respectivamente⁵⁴. Ainda que com resultados promissores, 59% dos pacientes tratados com a combinação desenvolveram algum tipo de toxicidade grave, enquanto a monoterapia com nivolumabe ou ipilimumabe possuíam taxas bem inferiores, 23% e 28% respectivamente.

Atualmente, ainda que se mantenha a mesma combinação terapêutica para pacientes com o diagnóstico acima descrito, o clinical trial CheckMate-511 propôs a inversão de doses num esquema ipilimumabe (1mg/kg) e nivolumabe (3mg/kg), o que reduziu as taxas de toxicidades graves sem alterar as taxas de resposta ao tratamento e que, até o momento, não atingiu a mediana de sobrevida global em nenhum grupo⁵⁵.

Outro tumor que ganhou destaque durante a implementação do uso de inibidores de *checkpoints* foi o CPNPC. Esse tumor é um dos tipos tumorais mais incidentes mundialmente e dentre os tumores de pulmão é o mais frequente podendo ser subdividido em carcinoma de células não escamosas (adenocarcinoma) e carcinoma de células escamosas⁵⁶.

Em CPNPC, ainda que o estudo clínico de fase III CheckMate-227⁵⁷ já esteja avançado, visando a aplicabilidade da terapia combinada de ipilimumabe e nivolumabe em câncer de pulmão, recorre-se, no entanto, em casos de tumores metastático sem mutações em EGFR ou ALK, ao uso de pembrolizumabe associado à quimioterapia (Cisplatina/Carboplatina + Pemetrexede), conforme Keynote-189⁵¹. Resultados atuais referentes ao Keynote-189

demonstram que o uso de pembrolizumabe com quimioterapia contribuiu com uma mediana da sobrevida global de 22 meses quando comparado aos 10,7 meses do grupo placebo associado à quimioterapia (pemetrexede+platina). Essa linha de tratamento melhora também a mediana de sobrevida livre de progressão, sendo de 9 meses em detrimento dos 4,9 meses daqueles pacientes em placebo⁵⁸.

Ainda que sejam promissores os resultados com o uso de anticorpos monoclonais bloqueadores de *checkpoints* imunológicos, as taxas de resposta completa ao tratamento variam muito entre os tumores, ficando em torno de 15% em melanoma avançado tratado com terapia combinada ipilimumabe e nivolumabe⁵⁵, e 1% em pacientes diagnosticados com CPNPC e tratados com pembrolizumabe e quimioterapia, cujas porcentagens se concentram em resposta parcial (47,1%) ou doença estável (36,6%)⁵⁸.

A fim de garantir melhores resultados ao tratamento, muitos estudos em execução buscam identificar biomarcadores capazes de prever resposta, de modo que seja oferecido ao paciente o esquema terapêutico que o beneficie com maiores taxas de resposta.

1.5. Eventos adversos imunomediados (irAEs)

Estudos realizados com a deleção dos genes responsáveis pela expressão de CTLA-4 e PD-1 em modelo murino, demonstraram que esses animais desenvolvem, respectivamente, doença linfoproliferativa⁵⁹ e doenças autoimunes (artrite, pancardite, entre outros)⁴². Tendo em vista o bloqueio desses receptores pelos anticorpos monoclonais utilizados na imunoterapia, é possível estimar o impacto que essa terapêutica poderia causar a nível sistêmico nos pacientes oncológicos.

Na imunoterapia com ICI, uma vez que as populações imunes têm uma sustentação dos sinais de ativação, além do desejável direcionamento de uma resposta imune para o sítio tumoral, alguns pacientes são acometidos por fortes inflamações extratumorais designadas como eventos adversos imunomediados (do inglês *immune-related adverse event* - irAE)⁶⁰.

Esses eventos são graduados e classificados conforme o *Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)* que atribui cinco graus de gravidade. Nos graus 1 e 2 (G1 e G2) há sintomas leves a moderados e comumente de forma localizada, não necessitando, na maioria das vezes, de intervenções clínicas invasivas. Por outro lado, eventos graduados como 3 e 4 (G3 e G4) são considerados eventos adversos graves e são clinicamente relevantes, necessitando de intervenções como hospitalização, além de em alguns casos serem uma ameaça

à continuidade do tratamento e à vida dos pacientes. O último grau (G5) inclui aqueles casos relacionados a óbito em decorrência da toxicidade⁶¹.

Em detrimento da maior utilização dos bloqueadores na rotina clínica oncológica e também as estratégias desses em combinação, estudo envolvendo diferentes tumores tratados com ICI demonstrou um aumento, de modo geral, na incidência das toxicidades⁶². Dentre os principais fármacos utilizados, uma revisão sistemática e meta análise apontou que a incidência combinada dos graus mais graves (G3-G4) divergia entre os imunoterápicos, a saber: atezolizumabe (15,1%), nivolumabe (14,1%), pembrolizumabe (19,8%) e ipilimumabe (28,6%). Dentre esses medicamentos, o estudo mensurou o ranking de segurança baseado na razão de chance de desenvolvimento de eventos imunomediados gerais (G1-G4) e aqueles graves (G3-G4), apontando o atezolizumabe como o bloqueador mais seguro (ranking de segurança: 76%), já quando utilizados dois ICI combinados a taxa de segurança do tratamento reduz drasticamente (40%)⁶³.

Nota-se que terapias com anti-PD-1 são melhor toleradas do que aquelas que envolvem o uso de anti-CTLA-4^{50,63}; tal evidência é explicada, principalmente, pela própria participação fisiológica da molécula de CTLA-4 na manutenção da tolerância periférica e do processo inicial de ativação de linfócitos T. Assim, o seu bloqueio leva a um aumento da proliferação de linfócitos T em conjunto com a redução da atividade supressora de Treg e, principalmente, quebra de um dos principais mecanismos de tolerância periférica^{35,64}.

Atualmente, com o avanço dos estudos clínicos, busca-se conciliar a redução da incidência de irAEs e garantir a resposta anti-tumoral eficiente. Exemplo desses estudos é o já mencionado Checkmate-511 no qual o ajuste de dose no esquema de tratamento da terapia combinada de nivolumabe (1mg/kg) e ipilimumabe (3mg/kg) para 3mg/kg e 1mg/kg, respectivamente, em melanoma avançado, reduziu a incidência de irAEs graves (G3-G5) de 48% para 34%⁵⁵. Em CPNPC, o uso apenas de anti-PD-1 (pembrolizumabe) como único imunoterápico demonstra menores taxas de eventos imunomediados graves, sendo a incidência de 10,9% segundo dados recentes do Keynote-189⁵⁸.

Dados referentes ao *Immunocancer International Registry* permitiram a identificação de 13.051 eventos reportados até Dezembro de 2018, dentre os quais prevalecem aquelas toxicidades que acometem, principalmente, o sistema endócrino, trato gastrointestinal e eventos de natureza pulmonar⁶². De maneira mais específica, podem ocorrer quadros de pneumonite, colite, rash cutâneo, hepatite, nefrite, miocardite, dentre outros, variando a incidência e letalidade desses eventos⁶⁵⁻⁶⁷.

Em conformidade com sua heterogeneidade fisiológica, as toxicidades imunomediadas

diferem entre si também em relação ao tempo que levam a se estabelecer desde o início da imunoterapia, bem como o tempo que levam para serem solucionadas. Grande parte das toxicidades ocorrem logo nos primeiros 4 meses após o início do tratamento e se resolvem igualmente em alguns meses, com destaque para aqueles eventos endócrinos que mesmo clinicamente solucionados, enquanto o paciente depender de terapia de reposição hormonal o evento não é considerado como resolvido^{68,69}.

Frente a tamanha diversidade e inespecificidade dos sintomas um dos grandes desafios decorrentes da imunoterapia com inibidores de *checkpoints* imunológicos é diagnosticar de maneira correta o desenvolvimento de toxicidades imunomediadas e realizar um manejo adequado. Assim, para determinação de uma toxicidade de fato imunomediada sempre leva-se em consideração a possibilidade de progressão tumoral, outros eventos como infecção e a possibilidade de evento adverso ao tratamento. Portanto, toxicidades imunomediadas, especialmente as mais brandas, podem não ser diagnosticadas corretamente e não receber o tratamento adequado⁶⁷.

Segundo as diretrizes brasileiras, no intuito de se minimizar quaisquer consequências decorrentes dos irAEs recomenda-se ao longo de todo o curso pré, durante e pós tratamento, a realização de exames específicos que permitem uma monitoração ativa e focada para identificação de possível toxicidade imunomediada. Além disso, essas diretrizes estabelecem um algoritmo que permite ao clínico se orientar frente ao cenário e realizar o manejo adequado, pensando tanto no tratamento da toxicidade como na continuação ou não do imunoterápico, e o conseqüente seguimento do paciente durante e após a toxicidade⁷⁰.

Ainda que muitas vezes os pacientes tenham boa resposta ao tratamento, cerca de 36,4% dos pacientes com melanoma tratados com imunoterapia combinada descontinuam o tratamento por toxicidade, e 9% de pacientes com CPNPC tratados com pembrolizumabe também interrompem. Esses dados evidenciam a influência do esquema de tratamento no desenvolvimento de irAEs, principalmente quando utilizados ICI em combinação, tendo em vista que comparativamente 6,9% dos pacientes com melanoma tratados em monoterapia com anti-PD1 (pembrolizumab) descontinuam tratamento⁷¹.

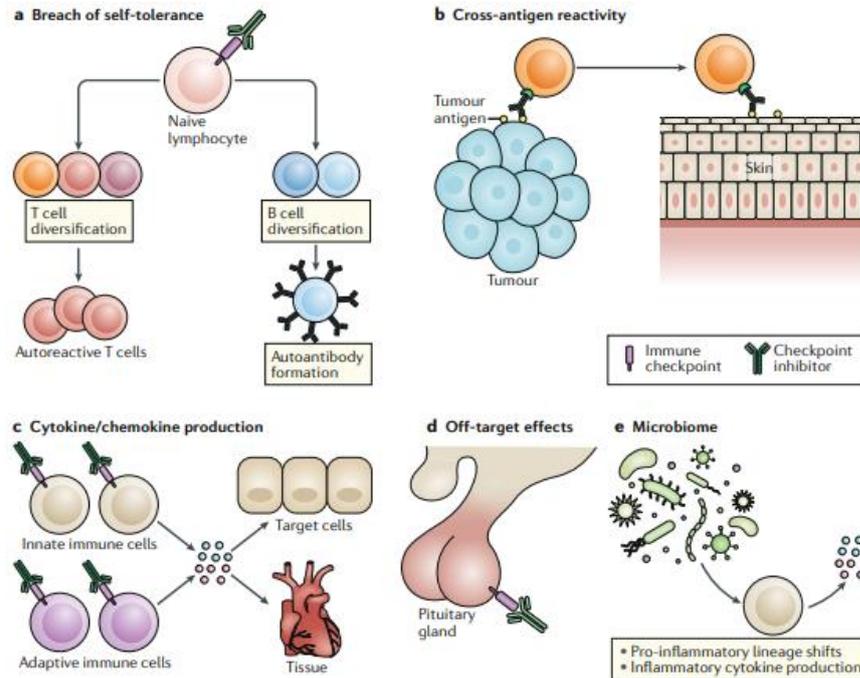
Como manejo clínico, o Grupo de Trabalho da Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica⁷⁰ descrevem que diante de toxicidades graves (G3 ou G4) segue-se à hospitalização e ao início de corticoterapia oral ou endovenosa que, quando não eficiente – toxicidades corticorrefratárias – requer o uso de infliximabe (bloqueador de TNF- α solúvel e transmembrana) ou algum imunossupressor como o micofenolato de mofetila (supressor da proliferação de linfócitos T e B⁷²). Nesses casos refratários a tratamentos e que necessitam

de descontinuação terapêutica o tratamento segue permanentemente suspenso em casos de toxicidade grau 4 com risco de morte, ou casos específicos de grau 3 (hepatite, por exemplo) e naqueles graus 2 que perduram por mais de 3 meses⁷⁰.

Diante de todas as características envolvidas no desenvolvimento de eventos adversos imunomediados, sua heterogeneidade, dificuldade de detecção, manejo e impacto direto no plano terapêutico dos pacientes oncológicos, muitos estudos voltam-se para as implicações clínicas desses quadros de hiperinflamação, de forma que, atualmente, carecem abordagens experimentais que busquem compreender exatamente os mecanismos pelos quais os eventos adversos imunomediados se estabelecem bem como sugerir possíveis biomarcadores que predigam o desenvolvimento de irAEs. Postula-se, portanto, que as vias das toxicidades imunomediadas, seriam similares às aquelas já descritas em processos inflamatórios, infecciosos ou de autoimunidade (Figura 5).

Inicialmente, uma vez que a imunoterapia visa o próprio bloqueio de CTLA-4, esse mecanismo de ação leva à quebra de tolerância periférica e permite a ativação sistêmica de linfócitos T e B autorreativos⁷³. O processo de reativação sistêmica de células imunes pode levar, também, a um reconhecimento cruzado entre antígenos de tecidos saudáveis com os de tecidos tumorais, de modo que a resposta montada seria, por especificidade do TCR, direcionada a ambos os sítios^{73,74}.

Diante da hiperativação de todo o sistema imune, a produção de citocinas e quimiocinas age adicionalmente sustentando a resposta imune pró-inflamatória sistêmica. Por fim, é possível a ocorrência do efeito *off-target*, no qual o bloqueio da molécula imunorreguladora influencia aqueles sítios em que sua expressão é constitutiva (a expressão de CTLA-4 é constitutiva na hipófise⁷⁵) e, também, uma possível participação do microbioma, podendo atuar tanto como um agente protetor quanto indutor de eventos adversos imunomediados⁷³.



Fonte: Retirado de *Esfahani et al*⁷³, 2020

Figura 5 - Fisiopatologia dos eventos adversos imunomediados. Acredita-se que os irAEs podem ser causados por uma variedade de fatores, desde a quebra de tolerância periférica (a), reação cruzada entre antígenos tumorais com antígenos de tecidos saudáveis (b), ação conjunta e sistêmica de citocinas e quimiocinas (c), efeito *off-target* (d) e participação do microbioma (e).

As principais pesquisas básicas e translacionais desenvolvidas voltam-se, em grande maioria, para a avaliação do processo inflamatório já estabelecido, por meio de avaliações histopatológicas ou avaliação dos constituintes imunes presentes no sítio inflamado^{74,76-78} e, em alguns casos, pela determinação de populações imunes celulares presentes anterior à imunoterapia e possíveis alterações dessas populações nos estágios iniciais do tratamento^{79,80}. Já foi avaliada também a presença de citocinas solúveis ao longo do tratamento e o possível envolvimento dessas no estabelecimento de toxicidades^{81,82}.

Esses estudos apontam, de modo geral, para um infiltrado imune rico em linfócitos T CD8⁷⁴, identificação de alterações em linhagens de células B (principalmente de subpopulações CD21^{low} e plasmócitos) no início da imunoterapia⁸⁰ e clusterização de subtipos de perfis de células T antes e após o início do tratamento, indicando participação importante de populações de linfócitos T CD4 principalmente de perfil Th17 e Treg⁷⁹.

Muito além da compreensão de quais populações estariam envolvidas no processo patológico dos irAEs, estudos já demonstram a importância em se avaliar, principalmente, parâmetros como a especificidade do TCR e a clonalidade de populações de linfócitos T e B^{74,77,78,83}. Essas abordagens sustentam-se, principalmente, na teoria do possível *crosstalk* entre

antígenos tumorais e antígenos presentes em tecidos saudáveis e apoia-se em achados clínicos onde, por exemplo, pacientes diagnosticados com melanoma em imunoterapia desenvolvem mais frequentemente toxicidades dermatológicas e menos pneumonite quando comparada a pacientes com CPNPC⁸⁴.

Mais recentemente, estudo demonstrou a relevância de linfócitos T CD4 efetores de memória ativados no desenvolvimento de irAEs. Essa população em pacientes com melanoma recebendo diferentes ICI e que desenvolveram toxicidade grave apresentava maior diversidade de TCR e, após início do tratamento, tinham maior preferência na expansão clonal. No entanto, mesmo com robustez de resultados, o estudo não estabeleceu a quais antígenos essa resposta era direcionada⁸⁵.

Acredita-se, portanto, que para compreensão do desenvolvimento de eventos adversos é necessário recorrer a uma variedade de abordagens imunológicas baseadas desde a identificação de populações celulares específicas e a capacidade dessas populações de reconhecer antígenos, até a identificação de vias envolvidas, as citocinas produzidas e as interações entre células imunes com as células tumorais e/ou do sítio inflamado.

2. HIPÓTESE

Trabalhamos com a hipótese de que as populações celulares imunes e analitos solúveis (quimocinas, citocinas e fatores de crescimento) presentes na circulação de pacientes submetidos à imunoterapia com inibidores de *checkpoint* imunológicos predizem, antes mesmo do início do tratamento, o eventual desenvolvimento de toxicidade imunomediada, sendo, portanto, possíveis indicadores desse desfecho clínico.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Identificar possíveis biomarcadores e mecanismos imunes responsáveis pelo desenvolvimento de eventos adversos em pacientes com melanoma ou CPNPC tratados com imunoterapia de inibidores de *checkpoints* imunológicos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Determinar populações celulares imunes presentes no sangue periférico associadas ao desenvolvimento de irAEs;
- 2.** Determinação de moléculas solúveis associadas ao desenvolvimento de irAEs presentes no plasma dos pacientes;
- 3.** Identificação de biomarcadores sistêmicos e mecanismos celulares e/ou solúveis associados ao desenvolvimento de irAEs tumor-específico e para ambos os tumores em conjunto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo prospectivo e não intervencionista compreende a caracterização de parâmetros imunes de 48 pacientes diagnosticados com melanoma (n=23) ou CPNPC (n=25) tratados em primeira linha com inibidores de *checkpoints* imunológicos. Esses pacientes foram submetidos à coleta de sangue no momento anterior à imunoterapia, utilizado para caracterização de populações imunes celulares (citometria de fluxo multiparamétrica das células mononucleares do sangue periférico) e dosagem de analitos solúveis presente no plasma (ensaio multiplex) (Figura 6).

Após avaliação clínica, os pacientes foram segregados conforme desenvolvimento de toxicidade imunomediada em *No/Mild* (G0-G2) e *Severe* (G3-G4), e esses grupos foram comparados tanto de modo tumor-específico, quanto agrupados independentemente do tipo tumoral.

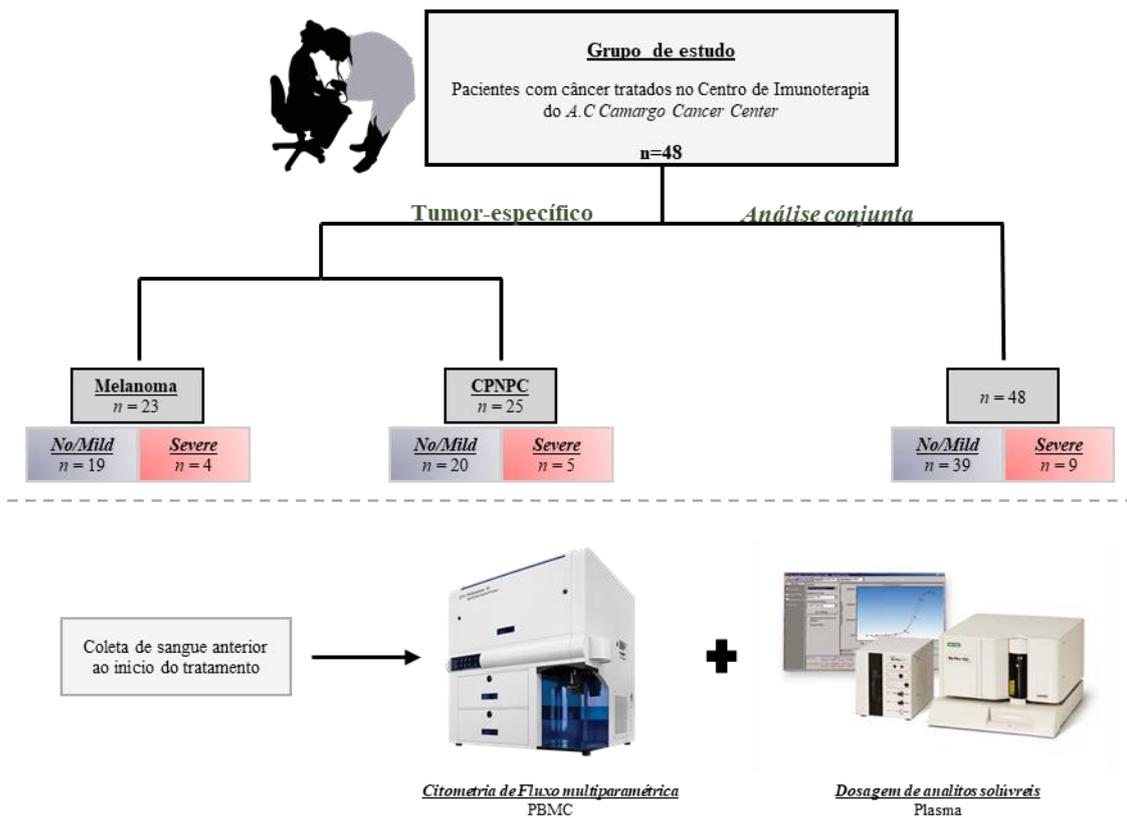


Figura 6 – Desenho experimental. Foram incluídos 48 pacientes diagnosticados com melanoma ou CPNPC virgens de tratamento e candidatos à imunoterapia com inibidores de checkpoints imunológicos em regime de monoterapia e/ou terapia combinada (antiPD-1, antiPD-1 + antiCTLA-4 ou antiPD-1 + QT). Esses pacientes foram graduados conforme desenvolvimento ou não de toxicidades imunomediadas e agrupados em *No/Mild* (G0-G2) e *Severe* (G3-G4). Após inclusão, foi realizada a coleta de sangue periférico anterior ao início da imunoterapia e o material foi fracionado em PBMC para análises por meio de citometria de fluxo multiparamétrica e plasma para a dosagem de analitos solúveis pela plataforma *Luminex*.

4.1. Recrutamento de pacientes

Conforme projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do AC Camargo Cancer Center (protocolo CEP nº 2671/19), foram recrutados 48 pacientes virgens de tratamento, diagnosticados com melanoma ou CPNPC, e candidatos à imunoterapia com inibidores de *checkpoints* imunológicos.

Todos os pacientes estiveram sob os cuidados dos oncologistas clínicos do Centro de Imunoterapia do AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brasil. Os procedimentos de diagnóstico e o tratamento do paciente foram feitos separadamente da decisão de incluí-lo no estudo. Todos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para sua inclusão neste estudo, de acordo com a declaração de Helsinki e aprovação pelo comitê de ética local.

Os pacientes candidatos possuíam idade superior a 18 anos, de ambos os sexos, diagnosticados com tumores localmente avançados ou metastáticos, tratáveis com imunoterapia contendo inibidores de *checkpoint* imunológicos (monoterapia com anti-PD-1 ou terapia combinada com anti-PD-1 e anti-CTLA-4 para os pacientes com melanoma ou anti-PD-1 e quimioterapia (Pemetrexede/Paclitaxel+Carboplatina) para os pacientes com CPNPC), todos em primeira linha de tratamento.

Não eram elegíveis para o estudo pacientes com doenças autoimunes diagnosticadas previamente ao início do tratamento bem como aqueles em uso crônico de corticosteroides ou que por algum motivo fazem uso de corticoide junto à imunoterapia desde o início do tratamento.

4.2. Avaliação do desenvolvimento de eventos adversos

A avaliação dos eventos adversos imunomediados foi realizada de forma independente por um oncologista clínico da instituição (Dr. Caio Dabbous de Liz), tendo sido utilizado o *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE) versão 5.0⁶¹. Os eventos foram graduados em grau 0 (G0), graus 1-2 (G1-G2) e graus 3-4 (G3-G4) e, posteriormente, os pacientes agrupados em dois grupos: *No/Mild* (G0-G2) e *Severe* (G3-G4).

Ainda que os eventos adversos possam ocorrer a qualquer ponto do tratamento, sendo sua maioria num período dentro de 6 meses^{69,86}, consideramos aqui, a avaliação feita até o período mínimo de um ano após o início da imunoterapia com inibidores de *checkpoint* imunológicos.

4.3. Processamento de amostras

Por se tratar de um projeto prospectivo não intervencionista, a coleta de sangue foi realizada em diversos momentos ao longo do tratamento quando essa já era prevista clinicamente (exames de rotina ou visitas de acompanhamento). Ainda que as coletas tenham acontecido de maneira seriada ao longo do tratamento, no presente trabalho avaliamos apenas aquelas amostras biológicas referentes a um momento anterior ao início do tratamento (*baseline*), tendo o sangue periférico sido coletado em tubos EDTA de 10 mL.

As amostras de sangue em tubos EDTA, mantidas à temperatura ambiente, foram centrifugadas em até 4 horas após a coleta, e o plasma foi removido e congelado a -80°C para dosagem posterior de componentes solúveis. O sangue restante foi diluído em PBS para purificação das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) utilizando gradiente de Ficoll. PBMCs foram congeladas em meio contendo DMSO e armazenadas em nitrogênio líquido para posterior análise de populações imunes celulares utilizando citometria de fluxo multiparamétrica.

4.4. Avaliação de populações imunes celulares por citometria de fluxo multiparamétrica

Para análise de PBMCs, as células foram descongeladas e confirmada sua viabilidade usando exclusão por azul de Trypan. Para avaliação da viabilidade por citometria de fluxo, utilizamos o marcador de viabilidade específico (*LIVE/DEAD Fixable Blue Dead Cell Stain Kit, for UV excitation, Thermo Fisher, #L23105*).

Após marcação de viabilidade, para o painel exaustão (Painel Linfoide + Cassete exaustão) e mieloide (Painel Mieloide + Cassete), as células não foram estimuladas, sendo incubadas por 16h em meio de cultivo, enquanto para o painel intracelular (Painel Linfoide + Cassete Intracelular), as células foram estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 pelas mesmas 16h. Ao término da incubação em estufa a $37^{\circ}\text{C}/ 5\% \text{CO}_2$, foi adicionada brefeldina para mais 4h de incubação. Ao fim, as células foram lavadas e ressuspensas na solução de marcação com a combinação de marcadores de interesse (Figura 7). No caso da marcação intracelular, as células foram fixadas e permeabilizadas logo após a marcação de superfície e antes da marcação de proteínas intracelulares.

O perfil de células imunes foi caracterizado por citometria de fluxo *high-dimensional* (FACSymphony A5, BD Bioscience), onde realizamos a avaliação de até 29 parâmetros simultaneamente. Todos os controles necessários de células com marcações individuais, bem

como células não marcadas, foram realizados. Esses painéis foram testados e confirmados antes do início do estudo para gerar matrizes de compensação e configurações do instrumento a serem utilizadas para cada amostra.

Especificidade	Fluorocromo	Clone	Painel	
Painel Linfóide				
Live / dead	BUV496		CORE PANEL	
CD45	BB790	HI30		
CD3	BUV661	UCHT1		
CD4	BV750	SK3		
CD5	BV786	UCHT2		
CD8	BUV805	SK1		
TCRgd	APC-R700	11F2		
CD45RO	BV570	UCHL1		
CD197 (CCR7)	BV650	2-L1-A		
CD127	BB700	HIL-7R-M21		
CD25	BUV563	2A3		
CD161	PE-Cy5	DX12		
CD56	APC	B159		
CD279 (PD-1)	BUV737	EH12.1		
CD95	PE-CF594	DX2		
CD152 (CTLA-4)	PE	BNI3		EXHAUSTION CASSETTE
CD223 (LAG3)	BUV615	T47-530		
CD366 (TIM-3)	BV421	7D3		
CD39	BV605	TU66		
CD19	BV510	SJ25C1		
CD38	APC-H7	HB7		
6B11 (INKT)	BV711	6B11		
CD183 (CXCR3)	BUV395	1C6/CXCR3		
CD294 (CRTH2)	FITC	BM16		
CD196 (CCR6)	PE-Cy7	11A9		
CD185 (CXCR5)	BB660	RF8B2		
INTRACELLULAR CASSETTE - with TOX				
Foxp3	AF488	259D/C7	INTRACELLULAR CASSETTE - with TOX	
TCF-1	BUV615	S33-966		
TOX	PE	TXRX10		
Ki-67	PE-Cy7	B56		
Granzyme B	BV510	GB11		
TNF- α	BUV395	MAb11		
IFN- γ	BV605	B27		
IL-17A	BV421	N49-653		
IL-10	BV711	JES3-9D7		
Painel mieloide				
Live / dead	BUV496		CORE PANEL	
CD45	BB790	HI30		
CD14	BUV805	M5E2		
CD16	AF700	3G8		
CD68	BV786	Y1/82A		
CD11c	BV421	B-ly6		
CD1c	BB700	F10/21A3		
CD123	PE-Cy5	9F5		
CD15	BV510	W6D3		
CD66b	AF647	G10F5		
Fc ϵ R1	BV605	AER-37		
HLA-DR	BUV661	G46-6		
CD141	BV711	1A4		
CD117 (cKit)	PE-CF594	YB5.B8		
CD19	BV750	SJ25C1		
CD11b	BV570	ICRF44		CASSETTE
CD169 (Siglec-1)	BB515	7-239		
CD206	PE-Cy7	19.2		
CD163	BV650	GHI/61		
CD80	BB755	L307.4		
CD86	BUV615	2331 (FUN-1)		
CD38	APC-H7	HB7		
CD2	BUV737	RPA-2.10		
CD274 (PD-L1)	BB630	MIH1		
CD273 (PD-L2)	BB660	MIH18		
TNF- α	BUV395	MAb11		
IL-10	PE	JES3-9D7		

Figura 7 - Anticorpos - Citometria de Fluxo. Painéis de anticorpos utilizados para marcação de PBMCs. (A) dois painéis foram focados em populações linfóides incluindo marcadores de exaustão (*Core Panel + Exhaustion Cassete*) e marcadores intracelulares (*Core Panel + Intracellular Cassete*); B) painel mieloide que compreende tanto marcadores extracelulares quanto intracelulares (*Core Panel + Cassete*).

4.4.1. Análises de dados - citometria de fluxo multiparamétrica

As análises empregadas para identificação de populações imunes foram realizadas com auxílio do software *FlowJo* (BD Biosciences)⁸⁷ e desenhadas a fim de garantir a obtenção das frequências de cada uma das populações de interesse por análise supervisionada dos dados, conforme apresentado abaixo (Figura 8). A expressão de moléculas características das principais populações imunes, citocinas e fatores de transcrição foram apresentados juntamente com os respectivos resultados.

Além da análise supervisionada, realizamos também uma análise não supervisionada dos dados, ou seja, sem a interferência do investigador. Inicialmente, realizamos para cada amostra a estratégia de gate apropriada para obtenção apenas de leucócitos (CD45+) viáveis (Live/Dead-). Em seguida, determinamos como *cut off* o mínimo de 2000 leucócitos por amostra e aquelas que não atendiam a esse critério foram excluídas. A fim de garantir números iguais de eventos por amostra, tornando a análise mais homogênea na avaliação entre os grupos, realizamos o Down Sample de todas as amostras possíveis para 2000 eventos e em seguida as concatenamos em um único arquivo. Esse processo de *downsampling* permite uma amostragem de nossos dados de modo a reduzir o número de eventos de forma aleatória e representativa do grupo arquivo como um todo, com o objetivo de igualar o número de eventos para todas as amostras utilizadas.

Para avaliação de dados de citometria de maneira não direcionada, isto é, de maneira exploratória, utilizamos o algoritmo de redução de dimensionalidade Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP), disponível no *FlowJo* (BD Biosciences). Em seguida, recorreremos às ferramentas *x-shift* e *FlowSOM*. Ambos os algoritmos visam a distinção entre populações celulares com base na expressão de cada um dos marcadores presentes em nossos painéis, no entanto, diferem entre si no fato de que a estratégia de clusterização do *x-shift* é dependente apenas do algoritmo, isto é, o número de cluster identificados é dado pela própria ferramenta, enquanto no *FlowSOM*, requer a inserção de quantos clusters são esperados pelo investigador. Sendo assim, para garantir a não supervisão da análise, recorreremos à avaliação primeiro pelo *xshift* e o número de cluster identificados por esse algoritmo foram aplicados para o *FlowSOM*, que por sua vez permite melhor visualização dos cluster identificados por meio de organização hierárquica.

Uma vez que não temos grupos balanceados em seu tamanho amostral, cada uma das populações obtidas no *FlowSOM* foi aplicada a cada um dos pacientes e obtidas as frequências dessas em cada indivíduo, o que nos permitiu avaliar as medianas de *No/Mild* e *Severe* em cada um dos grupos e comparar as frequências relativas conforme descrito a seguir em “4.6. Análise estatística”.

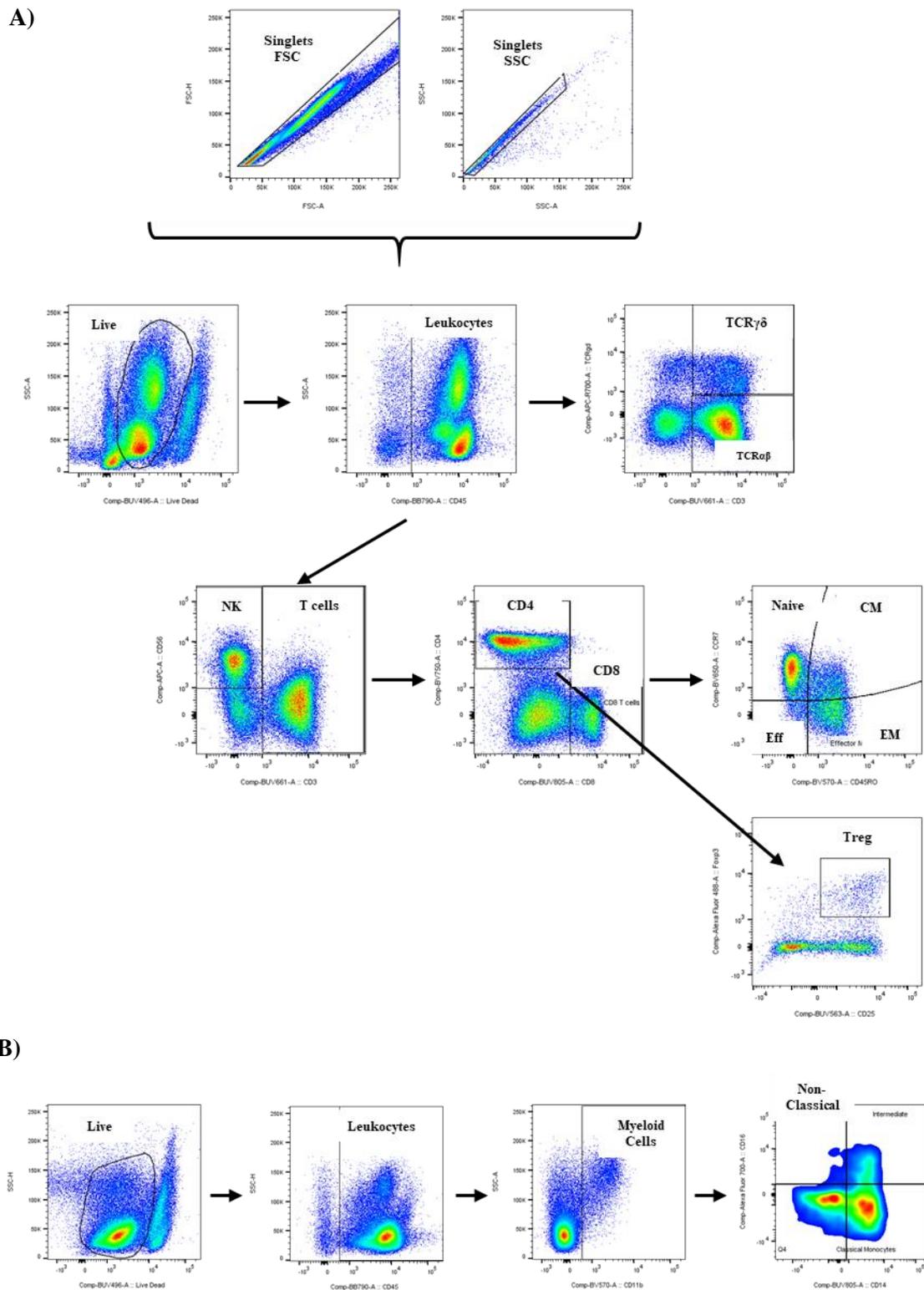


Figura 8 - Análise direcionada – PBMC. Para avaliação das subpopulações linfoides e mieloides bem como os seus perfis de ativação/exaustão, realizamos a marcação de PBMC descongelados e direcionamos a análise pelo software *FlowJo* como representado nos *dotplots*. Inicialmente excluímos *doublets* e consideramos dentre as células vivas (Live/Dead negativo) apenas os leucócitos (CD45+). Em seguida, determinamos as populações e subpopulações de interesse, e os marcadores de ativação e exaustão foram avaliados individualmente e em combinações. (A) Estratégia de gates para populações linfoides e de NK. (B) Estratégia de gates para populações mieloides.

4.5. Avaliação de citocinas e quimiocinas solúvel

Foram avaliadas 48 substâncias presentes no plasma dos pacientes, cobrindo atividades inflamatórias e anti-inflamatórias. Foi utilizado o kit multiplex para citocinas e quimiocinas humanas Bio-Plex Pro HumanCytokine48-Plex Immunoassay, na plataforma Luminex. O kit permitiu detectar FGF basic, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-1 α , IL-2R α , IL-3, IL-12 (p40), IL-16, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, GRO- α , HGF, IFN- α 2, LIF, MCP-3, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10, MCP-1 (MCAF), MIG, β -NGF, SCF, SCGF- β , SDF-1 α , MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , VEGF, CTACK, MIF, TRAIL, IL-18, M-CSF, TNF- β .

Resumidamente, as amostras de plasma foram ressuspensas com uma mistura de *beads* específicas para cada um dos analitos. O analito ligado foi então quantificado utilizando um anticorpo de detecção conjugado com um marcador fluorescente. A quantidade de cada analito em pg/mL foi calculada com base em uma curva padrão⁸⁸.

Para a avaliação desses dados, uma vez que alguns pacientes possuem dosagens muito discrepantes entre si, utilizamos o método de ROUT para identificação de possíveis *outliers*. O método de ROUT baseia-se na taxa de falsa descoberta e consideramos o parâmetro Q (chance de encontrar erroneamente um *outlier*) de 1%. Portanto, após a identificação de outliers pelo teste de ROUT em qualquer um dos grupos, eles foram excluídos antes de prosseguirmos às demais análises estatísticas.

4.6. Análise estatística

Inicialmente, para avaliação das variáveis qualitativas de nossa coorte, realizamos o teste exato de Fisher. Para aquelas variáveis quantitativas obtidas tanto dos dados de citometria de fluxo quanto da dosagem de analitos solúveis, utilizando tanto o MetaboAnalyst 5.0⁸⁹⁻⁹¹ quanto o *GraphPad Prism*, aplicamos o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e/ou Shapiro-Wilk para identificar aqueles grupos de dados que seguiam ou não uma distribuição normal. Para comparação entre os grupos, utilizamos no caso de amostras com distribuição normal, o teste t de Student com correção de Welch's, e naqueles casos sem distribuição normal o teste de Mann-Whitney.

Para avaliação da correlação entre parâmetros recorremos, novamente, aos testes de normalidades, e, uma vez que todos os parâmetros correlacionados não seguiam uma distribuição normal utilizamos a correlação de Spearman.

A relação entre os dados obtidos e o desfecho de interesse (irAEs grave) foi mensurado por meio de regressões logísticas tanto univariadas quanto multivariadas, utilizando o *GraphPad Prism*, onde obtivemos também as respectivas curvas ROC, as razões de chance (*Odds Ratio* – OR) no intervalo de confiança de 95% e o poder de predição positivo e negativo, nos casos das regressões multivariadas. Em todos os testes estatísticos, consideramos como diferença significativa $p < 0,05$ e como tendência $p < 0,1$.

Para a elaboração das redes de interações, utilizamos a ferramenta online *STRING v11*⁹² que permite, por meio da escolha de moléculas (genes), identificar suas possíveis relações com base nos bancos de dados, menções simultâneas na literatura e na sua co-expressão/co-ocorrência.

O heatmap e o PCA foram elaborados com o auxílio da ferramenta *ClustVis*⁹³ (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>), e utilizamos a correlação como método para clusterização das amostras. Para diminuir discrepância de escala dentro dos parâmetros, os valores foram transformados em $\ln(x+1)$.

5. RESULTADOS

5.1. Características clínicas dos pacientes

Foram incluídos no estudo 48 pacientes diagnosticados com melanoma ou CPNPC, candidatos à imunoterapia com inibidores de *checkpoints* imunológicos em primeira linha. Após inclusão no projeto e consequente início do tratamento, os pacientes foram seguidos por no mínimo um ano e agrupados, conforme avaliação de um mesmo oncologista clínico, naqueles que não desenvolveram eventos adversos (G0) ou o desenvolveram de maneira branda (G1-G2), em “*No/Mild*” (81,25%), enquanto pacientes com toxicidade grave (G3-G4) foram agrupados em “*Severe*” (18,75%), conforme Tabela 1.

O parâmetro quantitativo (idade) foi comparado utilizando o teste de Mann-Whitney para dados não-paramétricos e para estabelecer possível relação entre parâmetros qualitativos e o desfecho clínico, aqui considerado o desenvolvimento de eventos adversos imunomediados grave, utilizamos o teste exato de Fisher. Em ambos os casos, determinamos como diferença estatística $p < 0,05$ sendo o valor apresentado na tabela como *p-value*.

A idade mediana (63,8 anos) dos pacientes foi calculada com base na data do início do tratamento, não apresentando diferença estatística entre os grupos. Os parâmetros subsequentes também não retornaram diferença estatística após teste de Fisher, não sendo, portanto, associados diretamente, pelo menos em nossa coorte, ao desenvolvimento de toxicidade imunomediada. Quando comparado à literatura a falta de associação entre os parâmetros, especialmente tipo de tratamento e resposta, divergem dos estudos clínicos possivelmente devido ao tamanho amostral reduzido de nossa coorte.

Tabela 1 - Características dos pacientes

	Total (n = 48)	No/Mild (n = 39)	Severe (n = 9)	p-value
Idade, anos	63.80 (24.80-79.40)	63.70 (24.80-79.40)	68.50 (26.20-75.70)	0.912
Sexo				0.451
Masculino	29 (60.42%)	25 (64.10%)	4 (44.44%)	
Feminino	19 (39.58%)	14 (35.90%)	5 (55.56%)	
Tumor				1
Melanoma	23 (47.92%)	19 (82.61%)	4 (17.39%)	
CPNPC	25 (52.08%)	20 (80.00%)	5 (20.00%)	
Estadiamento				1
III	14 (29.17%)	12 (85.71%)	2 (14.29%)	
IV	34 (70.83%)	27 (79.41%)	7 (20.59%)	
Imunoterapia				1
αPD1	27 (56.25%)	22 (81.48%)	5 (18.52%)	
αPD1+αCTLA-4	21 (43.75%)	17 (80.95%)	4 (19.05%)	
Resposta				1
Sim	28 (58.33%)	23 (82.14%)	5 (17.86%)	
Não	20 (41.6%)	16 (80.00%)	4 (20.00%)	
Tipo de Resposta				
Completa	6 (12.5%)	5 (14.29%)	1 (7.69%)	
Parcial	20 (41.67%)	17 (85.00%)	3 (15.00%)	
Doença estável	2 (4.17%)	1 (5.00%)	1 (5.00%)	
Progressão	19 (39.58%)	16 (45.71%)	3 (23.08%)	
Pseudo Progressão	1 (2.08%)	0 (0.00%)	1 (7.69%)	

Legenda: Os valores apresentados em mediana (Min-Max) ou n (%), sendo *p-value* referente à comparação entre os grupos por meio de Mann-Whitney (idade) ou teste exato de Fisher.

A resposta à imunoterapia foi avaliada por oncologistas clínicos especialistas na topografia tumoral (pele e região torácica). Por se tratarem de tumores diferentes, os tipos de avaliações clínicas também diferem. Quando avaliado apenas resposta (Sim e Não) foram considerados como respondedores (58,33%) aqueles pacientes com resposta completa, resposta parcial ou doença estável e não respondedor (41,60%) aqueles com progressão da doença. A avaliação considerada no estudo envolveu aquela primeira avaliação de resposta realizada pelos pacientes que, no entanto, não demonstrou associação com o desenvolvimento de irAEs.

Uma vez que separamos a coorte em dois grupos, segregamos também os tipos de eventos adversos imunomediados graves presentes no grupo *Severe* (Tabela 2). Dentre os 9 pacientes, tanto o desenvolvimento de pneumonite quanto o desenvolvimento de toxicidade hepática foram os eventos imunomediados mais comuns, ocorrendo em 3 pacientes de nossa coorte.

Tabela 2 - Distribuição dos eventos adversos imunomediados

Evento Adverso Imunomediado (irAEs)	Severe (n = 9)
Pneumonite	3 (33.33%)
Hepatite	3 (33.33%)
Nefrite	1 (11.11%)
Hipofisite	1 (11.11%)
Polineuropatia	1 (11.11%)

Legenda: Frequências absoluta e relativa apresentados em n (%).

Nessa coorte, todos receberam algum tipo de manejo medicamentoso, seja ele com o uso de corticoide isolado (n=5), corticoide associado a um imunossupressor (administrados nos 3 casos de hepatite), além de um único paciente que recebeu imunoglobulina ao desenvolver polineuropatia.

Além das frequências de irAEs e demais parâmetros qualitativos, avaliamos, também, o tempo até o desenvolvimento da toxicidade a partir do início do tratamento, bem como o seu curso clínico e resolução (Figura 9).

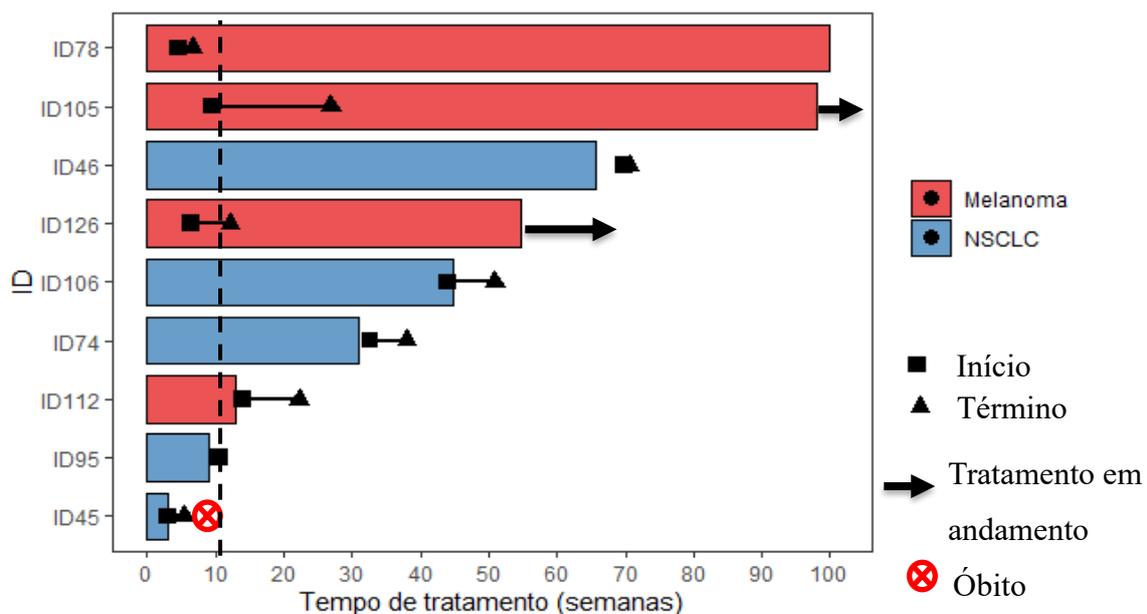


Figura 9 – Tempo de desenvolvimento de toxicidade aos inibidores de checkpoints. *Swimmer plot* referente ao desenvolvimento de eventos adverso ao longo do tratamento, em semanas. O tracejado preto indica a mediana de tempo de desenvolvimento de eventos adverso na coorte total.

A mediana global do início do desenvolvimento de eventos adversos graves foi de 10,67 semanas, como demonstrado pelo tracejado da figura acima, com valores mínimo e máximo de 3 e 69,9 semanas, respectivamente. Quando segregado por tipo tumoral, observamos que aqueles pacientes diagnosticados com melanoma, cujo tratamento principal nesse grupo foi nivolumabe (3mg/kg) associado a ipilimumabe (1mg/kg), possuem uma mediana de 8 semanas, indicando que desenvolvem toxicidade imunomediada mais precocemente quando comparado à coorte total e à coorte de CPNPC que, tratados com pembrolizumabe + carboplatina + pemetrexede (Adenocarcinoma) ou pembrolizumabe + carboplatina + paclitaxel (Células escamosas), têm mediana de 32,7 semanas. Vale ressaltar, ainda, que a mediana de tempo de tratamento e de duração de toxicidade global foram, respectivamente, 44,9 e 5,5 semanas e o tempo de follow-up mediano nesse grupo foi de 53 semanas.

5.2. Linfócitos T CD4 de possível perfil Th1 podem desempenhar importante papel no desenvolvimento de irAEs em pacientes com melanoma

Inicialmente, sabendo da heterogeneidade tumoral, suas características fisiopatológicas distintas e tratamentos igualmente distintos entre melanoma e CPNPC, seguimos com uma abordagem tumor-específica para caracterização imune do desenvolvimento de eventos adversos imunomediados.

Na coorte de melanoma, 19 (82,61%) pacientes foram classificados como G0 a G2 e, portanto, *No/Mild*, enquanto 4 (17,39%) pacientes apresentaram irAEs graves e, portanto, foram agrupados no grupo *Severe*. Dos 4 casos de toxicidade imunomediada, 2 deles foram diagnosticados como hepatite, determinada, principalmente pelas alterações das transaminases TGO e TGP, enquanto os demais casos tratam-se de hipofisite e pneumonite.

Assim como avaliado na coorte total, buscamos dependência entre as variáveis, sobretudo clínicas como o tipo de tratamento, estadiamento e resposta, com o desfecho de interesse, no entanto, nenhuma delas retornou diferença significativa e, portanto, não foram associadas ao desenvolvimento de eventos adversos imunomediados.

Sendo assim, de maneira exploratória e abrangente, buscamos, num primeiro momento, diferenciar possíveis populações celulares imunes que fossem diferentes quantitativamente entre pacientes *No/Mild* e *Severe*. Com essa finalidade, recorreremos à marcação das células mononucleares do sangue periférico. Essas foram descongeladas e submetidas à citometria de

fluxo com avaliação de até 29 parâmetros por painel e os dados brutos analisados como demonstrado na figura 8.

Como ponto de partida, optamos por avaliar os marcadores extracelulares referentes aos diferentes subtipos de linfócitos T CD4 auxiliar (Th) e de linfócitos T CD8 citotóxicos (Tc). Em nosso painel linfoide com marcadores de exaustão possuímos receptores presentes em populações Th1 (CXCR3), Th2 (CRTH2) e Th17/Th22 (CCR6)⁹⁴ e, portanto, avaliamos a expressão desses de modo geral e em populações específicas.

Para essa avaliação, utilizamos os dados de 21 pacientes previamente concatenados e sobreposamos os histogramas de cada grupo estudado para cada um dos receptores: CXCR3, CRTH2 e CCR6 dentro da população de leucócitos (CD45+), como observado na figura 10A.

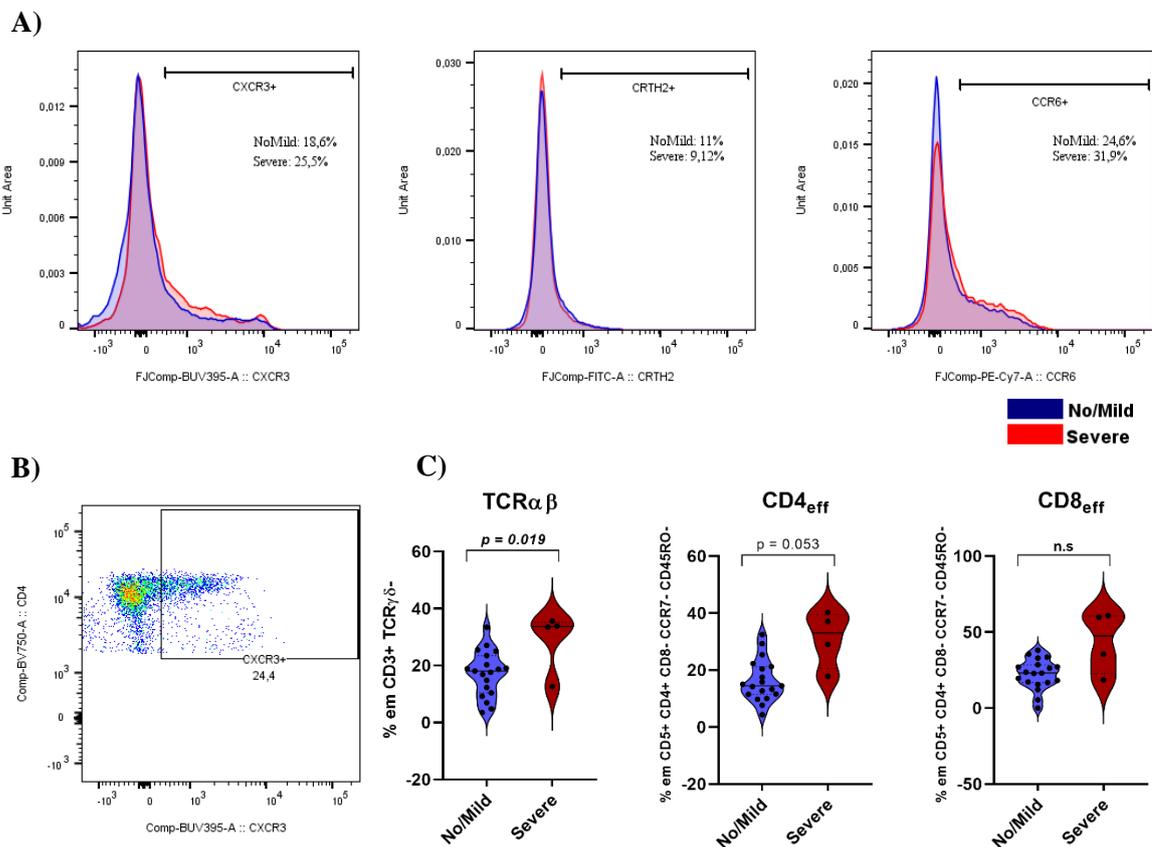


Figura 10 - CXCR3 como importante marcador em pacientes Severe em melanoma. Avaliação dos receptores característicos de populações de linfócitos T CD4 auxiliares (A) histograma de CXCR3, CRTH2 e CCR6, respectivamente com sobreposição dos grupos *NoMild* (n=17) e *Severe* (n=4) e as frequências de cada um dos marcadores nas respectivas populações. (B) dotplot representativo da expressão de CXCR3. (C) violin plot referentes às populações imunes CXCR3+. A mediana é demonstrada pela linha preenchida no interior do violin e o 1° e 3° quartil representados pelas linhas pontilhadas. Nos testes estatísticos realizados, foi considerado $p < 0,05$ como diferença estatística e $p < 0,1$ como tendência e os respectivos valores apresentados no gráfico, sendo n.s = não significativo.

Quando avaliados os histogramas e as frequências das populações podemos perceber um discreto aumento na expressão de CXCR3 e CCR6 no grupo *Severe* em detrimento de *No/Mild*. Uma vez que os histogramas são limitados, nesse caso, a uma comparação principalmente visual, seguimos para uma análise direcionada (Figura 10B) da expressão desses marcadores nas populações linfoides em cada um dos pacientes.

Uma vez obtidas as frequências relativas de populações positivas para os receptores em questão, realizamos análises estatísticas para identificarmos diferenças entre os pacientes que desenvolveram ou não toxicidade grave à imunoterapia (Figura 10C), retornando uma confirmação estatística do aumento de populações imunes CXCR3+, mas não de CCR6, em *Severe* quando comparados a *No/Mild*, especialmente nas populações linfoides TCR $\alpha\beta$ (CD3+ TCR $\gamma\delta$ -) e CD4 efetora – CD4_{eff} (CCR7- CD45RO-). Ressaltamos aqui, a diferença entre as medianas (mediana \pm desvio padrão) de CD4 efetora CXCR3+ dos dois grupos, sendo 31,03 \pm 10,00 em *Severe* e 16,26 \pm 7,33 em *No/Mild*., indicando uma possível relevância dessa população no curso do desenvolvimento dos eventos adversos imunomediados.

Sabendo da relevância desse marcador e sua alta expressão em linfócitos T CD4 de perfil Th1, nos questionamos se especialmente a população de linfócitos T CD4 efetores CXCR3+ estaria associada a uma resposta Th1. Para melhor caracterização desse perfil, é importante a avaliação da expressão de IFN- γ nessas populações⁹⁴, no entanto, uma vez que o receptor CXCR3 encontra-se no painel com marcadores de exaustão e as moléculas intracelulares no painel com moléculas intracelulares, tornou-se inviável uma análise de co-expressão entre CXCR3 e IFN- γ .

Como maneira de solucionar essa limitação experimental, avaliamos a expressão de IFN- γ nas populações de linfócitos T CD4 efetores no painel intracelular. Cabe destacar que em se tratando de um painel com estímulo policlonal (anti-CD3 e anti-CD28), utilizamos nas estratégias de análise o CD5 como marcador de linfócitos, uma vez que a utilização do próprio CD3 enquanto marcador dessa população torna-se inviável já que esse pode sofrer internalização celular.

Sendo assim, realizamos a estratégia de análise para obtenção das frequências de linfócitos T CD4 efetores (Figura 11A) e identificamos o aumento dessas populações efetoras expressando IFN- γ , mas não PD-1, em pacientes que desenvolvem toxicidades G3-G4 (0,037 \pm 0,011). Esse achado indica uma população que, além de efetora, se encontra ativada, mas não em processo de exaustão.

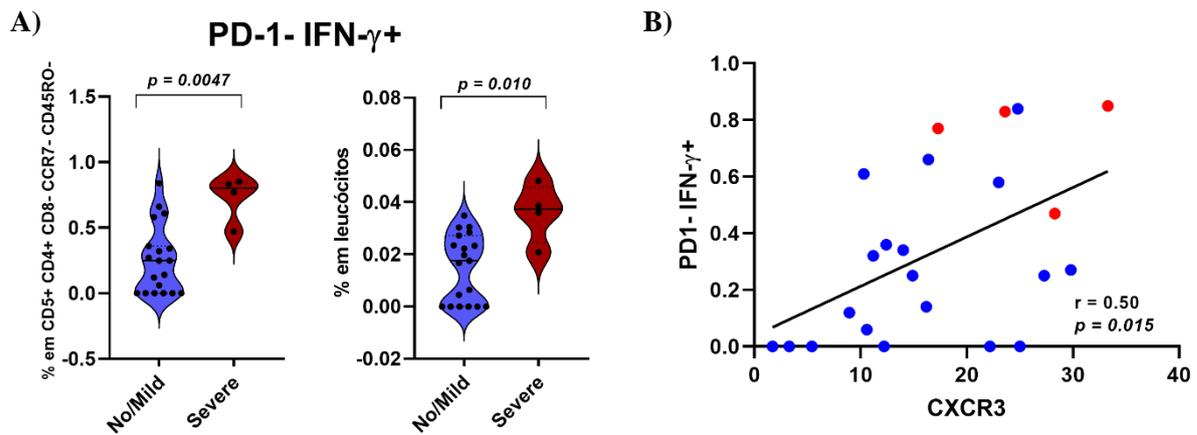


Figura 11 - Caracterização de subpopulação Th1 em melanoma. Avaliamos a expressão diferencial de IFN- γ como importante molécula na determinação de linfócitos T CD4 de perfil Th1 (A) aumento de linfócitos T CD4 efetores PD1- IFN γ + ($p < 0.05$) tanto em avaliação de linfócitos T CD4 efetores quanto de leucócitos totais. (B) Para determinar o possível perfil Th1 dessa população de linfócitos T CD4 efetores (CD5+ CD4+ CCR7- CD45RO-), correlacionamos a frequência de PD1- IFN γ + e CXCR3+ (% em CD4_{eff}) utilizando o teste de Spearman, onde indicamos o valor da correlação (r) e o p -value, considerado como significativo se $p < 0.05$ ($n = 23$). Em vermelho, destacamos aqueles pacientes com toxicidade G3-G4 e em azul pacientes G0-G2.

No intuito de confrontar os dados obtidos em diferentes painéis de citometria de fluxo e, assim, caracterizar a população efetora (CD5+ CD4+ CCR7- CD45RO-) expressando CXCR3 e IFN- γ como linfócitos T CD4 de perfil Th1, realizamos uma correlação de Spearman (Figura 11B) entre as populações encontradas, incluindo todos os pacientes da coorte de melanoma, e obtivemos uma correlação moderada e significativa ($p < 0.05$), indicando que pacientes que possuem maior expressão de CXCR3+ em linfócitos T CD4 efetores, também produzem mais IFN- γ nessa mesma população após estímulo policlonal.

Desse modo, uma vez que constatamos que pacientes com irAEs graves possuem maior frequência de linfócitos T CD4 efetores CXCR3+ e IFN- γ + (Figuras 10C e Figura 11A, respectivamente) e mediante moderada correlação, acreditamos que pacientes *Severe* possuem linfócitos T CD4 de perfil Th1 em maior frequência quando comparados a pacientes *No/Mild*, achado esse que pode, futuramente, ser confirmado em experimentos com painel envolvendo CXCR3 e IFN- γ em conjunto e, também, submetidos às mesmas condições de estímulo.

Como CXCR3 é um receptor importante em diversas vias imunológicas, utilizamos a ferramenta STRING para predição de moléculas associadas ao eixo do CXCR3. Por essa ferramenta, inserimos os genes CXCR3, IFNG, CD4 e IL2 que são correspondentes às principais populações encontradas e, no caso do gene referente à IL-2, adicionamos por ser uma importante citocina no processo de ativação e proliferação de linfócitos. Extrapolamos a rede inicial para a determinação de possíveis moléculas-chaves da via e consideramos, na

plataforma, correlações fortes (acima de 0.900) advindas de bancos de dados, experimentos e/ou citações em conjunto na literatura.

As linhas presentes na rede indicam as interações entre as moléculas e sua espessura a força da correlação (Figura 12). Destaca-se, logo na rede inicial, a interação entre CXCR3 e IFNG corroborando nossos achados da citometria de fluxo. Quando extrapolamos a rede de interações, observamos a mesma forte correlação entre CXCR3 e CXCL9, CXCL10 e CXCL11, que são citocinas tidas como os principais ligantes do CXCR3.

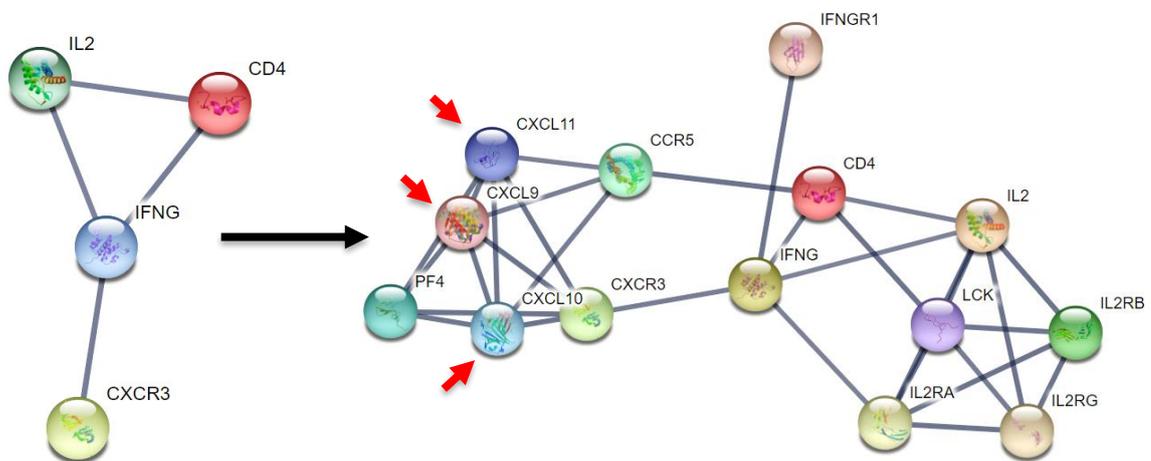


Figura 12 - Eixo CXCR3 identificado na coorte de melanoma. Para determinar possíveis parâmetros correlacionados, especialmente, com CXCR3 e IFN γ , utilizamos a ferramenta *STRING* e extrapolamos para vias relacionadas. As linhas indicadas em azul demonstram a correlação, de modo que quanto maior a força entre os parâmetros maior a espessura das mesmas. A seta preta indica o sentido da extrapolação da rede inicial e as setas vermelhas indicam os principais ligantes do CXCR3.

Com os dados de citometria de fluxo indicando a importância de CXCR3 no desenvolvimento de eventos adversos imunomediados graves e a rede de interações previstas por meio de dados públicos, seguimos para a avaliação da dosagem de CXCL9 e CXCL10 presentes no *Bio-Plex Pro Human Cytokine 48-Plex Immunoassay*.

Num primeiro momento, avaliamos se esses analitos encontravam-se diferentemente presentes no plasma dos pacientes *No/Mild* ($n=16$) ou *Severe* ($n=3$). Destacamos que a redução de n amostral na avaliação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento se dá pela dosagem de analitos pela plataforma Luminex não ter sido realizada para todos os pacientes do estudo.

Não encontramos nenhuma diferença de dosagem entre os analitos nos grupos de estudo (Figura 13A), indicando que, mesmo que haja um aumento de populações T CD4 efetoras

CXCR3+ em Severe, o aumento de frequência na expressão do receptor não está acompanhado do aumento de seus ligantes no momento anterior ao início da imunoterapia.

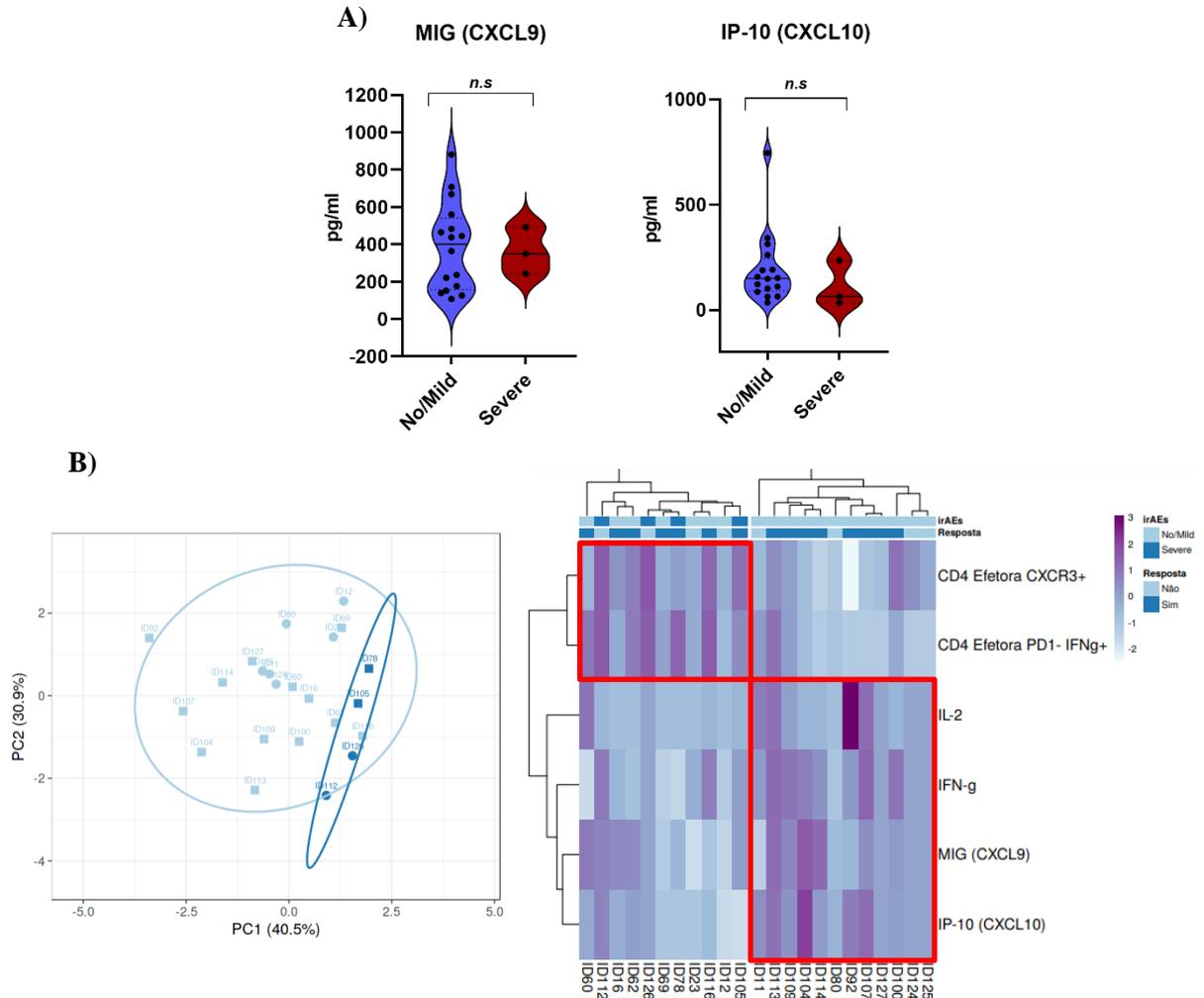


Figura 13 - Dosagem dos ligantes de CXCR3 no plasma da coorte de melanoma (A) os ligantes de CXCR3, MIG (CXCL9) e IP-10 (CXCL10), foram dosados em 19 pacientes pela plataforma bioplex. Outliers foram identificados pelo teste de ROUT e retirados da análise e em seguida realizamos a comparação entre os grupos *No/Mild* (n=16) e *Severe* (n =3). n.s = não significativo. (B) uma vez identificado o eixo de CXCR3 pela plataforma STRING, correlacionamos achados da citometria e a dosagem de citocinas de modo a obter o *Principal Component Analysis – PCA* e o *heatmap*, respectivamente. Em azul escuro aqueles pacientes com toxicidades G3-G4 e em azul claro G0-G2.

Diante da rede de interações e os dados de citometria de fluxo, seguimos para uma análise de correlação entre os resultados de ambas as técnicas e a representamos no PCA e *heatmap*, respectivamente (Figura 13B). Quando realizada a clusterização não supervisionada baseada na correlação, nota-se que os parâmetros segregam dois grandes grupos: um totalmente composto por pacientes sem toxicidade ou com toxicidade leve e marcado pela baixa expressão de

CXCR3 e IFN- γ + e maior dosagem de CXCL9 e CXCL10, e outro grupo misto com pacientes *NoMild* e todos os pacientes *Severe*, onde observamos maior expressão de CXCR3 e IFN- γ +

Os parâmetros mais relevantes para essa clusterização foram CD4 efetora CXCR3+ ou PD-1- IFN- γ + que se apresentam, como esperado pelos resultados anteriores, aumentados no *cluster* que engloba os pacientes com toxicidade grave (à esquerda), e as citocinas aparentemente presentes em maior concentração em pacientes sem toxicidade expressiva (à direita). Cabe ressaltar que essas citocinas, mesmo que fortemente correlacionadas entre si no *heatmap*, não apresentam diferença estatística entre os grupos.

Por fim, tendo em vista a importância principalmente do eixo CXCR3, e dada a sua maior praticidade vislumbrando seu uso enquanto biomarcador, já que sua determinação por citometria de fluxo não requer marcação intracelular e nem estímulo, possuindo melhor custo-benefício, recorreremos à regressão logística univariada para avaliação do poder de predição da população.

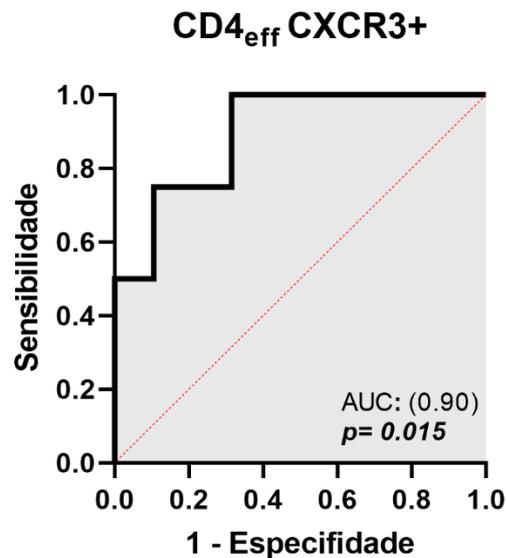


Figura 14 - Curva ROC referente à regressão logística univariada de $CD4_{eff}$ CXCR3+ em melanoma. Para o cálculo da regressão logística univariada, utilizamos a frequência CXCR3+ em linfócitos T CD4 efetores e obtivemos a respectiva curva ROC e os valores de AUC (*area under the curve*) e p (*p-value*), sendo a regressão considerada significativa quando $p < 0,05$.

Para tal teste estatístico utilizamos a população de linfócitos T CD4 efetores CXCR3+ (Figura 14) para avaliar a especificidade e sensibilidade dessa população em prever o desenvolvimento de irAEs graves. Obtivemos, assim, a curva ROC representada acima e os valores de área abaixo da curva (AUC) de 0,90 com valor de p significativo ($p < 0,05$). Com

base nos valores obtidos na regressão logística inferimos que o modelo e o parâmetro celular utilizados seriam eficientes para a predição de toxicidade grave. O mesmo parâmetro apresenta uma razão de chance (*odds ratio*) de 1,218 com intervalo de confiança de 1,057 a 1,543. Desse modo, a cada aumento de 1 unidade de CXCR3+ na frequência relativa de linfócitos T CD4 efetores, as chances de desenvolver toxicidade imunomediada grave aumenta em 21,8%.

Uma vez que nosso n amostral na coorte de melanoma, especialmente no grupo de irAEs graves, que é o desfecho de interesse, é reduzido (n = 4), sabemos da importância de se validar em uma coorte maior.

Esses resultados apontam, de fato, para importância de CXCR3+, bem como de linfócitos T CD4 de possível perfil Th1 (Figuras 10 e 11, respectivamente), no desenvolvimento de eventos adversos em coorte de pacientes com melanoma avançado tratados com imunoterapia de inibidores de checkpoints num regime nivolumabe (3mg/kg) associado a ipilimumabe (1mg/kg) ou pembrolizumabe.

5.3. Balança imune composta por populações imunes pró-inflamatórias e citotóxicas anterior ao início da terapia com ICI direciona o desenvolvimento de irAEs graves em CPNPC.

Nossa coorte de pacientes diagnosticados com CPNPC foi composta por 25 pacientes que, após avaliação de desenvolvimento de toxicidades imunomediadas por um oncologista clínico, foram agrupados 80% como *No/Mild* (G0-G2) e 20% em *Severe* (G3-G4). Os pacientes foram tratados em regime com anti-PD-1 (pembrolizumabe) associado à quimioterapia (carboplatina + Pemetrexede/Paclitaxel) e tiveram mediana, a partir do início do tratamento até o desenvolvimento de eventos adversos, de 32,7 semanas. Pneumonite foi a toxicidade mais frequente, compreendendo 2 dos 5 casos totais de eventos adversos graves em CPNPC (n=5). Como manejo clínico, 3 dos pacientes receberam como tratamento o uso de corticoides, e os dois casos restantes, polineuropatia e hepatite, foram tratados com imunoglobulina e associação de corticoide e imunossupressor, respectivamente.

Dentre as variáveis qualitativas dessa coorte, após teste exato de Fisher, não encontramos diferença estatística que indicasse associação entre variáveis sexo, resposta ao tratamento e estadiamento com o desenvolvimento de irAEs grave. As medianas de idade também foram semelhantes em ambos os grupos.

Inicialmente, avaliando as populações imunes de modo geral, observamos que pacientes que não apresentaram toxicidades imunomediadas possuíam maior frequência de populações TCR $\gamma\delta^+$ e CD4 $^+$, representadas na figura 15A, pelos valores de mediana de cada grupo.

Para a avaliação de populações imunes de maneira global e não direcionada recorremos à ferramenta UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection), para a qual realizamos a clusterização de leucócitos viáveis de 19 pacientes, sendo 14 *No/Mild* e 5 *Severe*, com base na expressão dos marcadores presentes no painel linfóide intracelular, à exceção do marcador de viabilidade e CD45 por terem sido utilizados manualmente para obtenção de leucócitos viáveis utilizados para a análise por UMAP (Figura 15B).

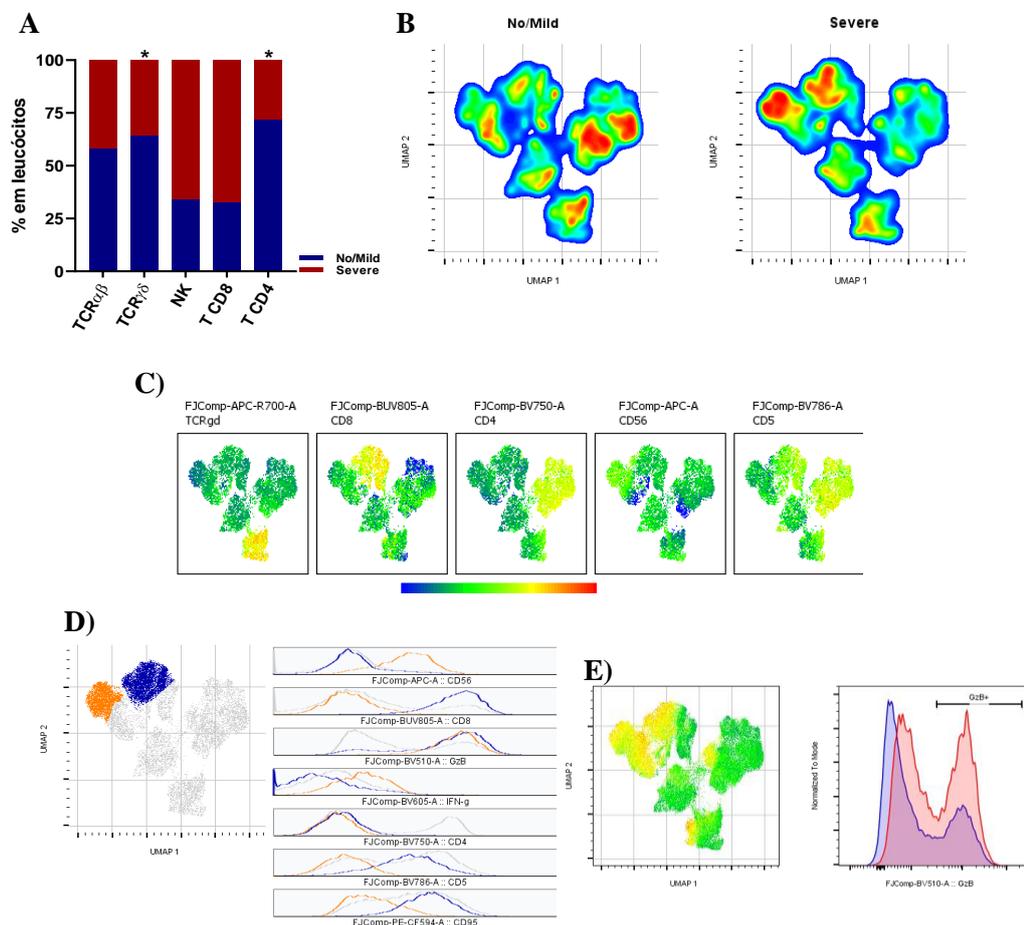


Figura 15 - Caracterização de populações citotóxicas diferencialmente expressas no UMAP de CPNPC. **(A)** Por meio do teste de Mann-Whitney comparamos a frequência relativa dentro de leucócitos de cada uma das principais populações imunes e representamos graficamente com base na mediana de cada um dos grupos. O (*) indica diferença estatística, tendo sido considerado $p < 0,05$. **(B)** Estratégia de redução de dimensões (UMAP) com os dados de citometria de fluxo multiparamétrica do painel intracelular, tendo sido utilizados para clusterização todos marcadores do painel linfóide intracelular dentro de leucócitos viáveis (CD45 $^+$ Live/Dead $^-$). **(C)** *Multigraph color mapping* indicando a expressão e localização dos principais marcadores de populações imunes **(D)** Identificação manual de população diferencialmente presente no UMAP *Severe* e caracterização por meio dos histogramas **(E)** expressão de granzima B (GzB) nas amostras concatenadas, evidenciando sua localização no UMAP (à esquerda) e a diferença de intensidade entre *No/Mild* (n=14) e *Severe* (n=5) pelo histograma (à direita).

Após clusterização, demonstramos a expressão e localização dos principais marcadores de populações imunes presentes no painel (Figura 15C) e caracterizamos, por meio de demarcação manual e avaliação dos histogramas, duas populações que aparentaram estar aumentada em pacientes com toxicidade grave (Figura 15D), sendo uma delas uma população de NK (CD56+ CD5- IFN- γ +) e outra de linfócitos T CD8 (CD56- CD5+ CD4- CD8+ CD95+), ambas produtoras de granzima B.

Ressaltamos, ainda, que ao demarcarmos populações diferencialmente expressas em *Severe* e não em *No/Mild*, buscamos evitar um viés na avaliação visual uma vez que esse último grupo, por ter mais pacientes e conseqüentemente mais eventos totais, tende a fortalecer alguns clusters, simplesmente pelo número maior de eventos e não necessariamente pela expressão diferencial.

Frente a isso, acreditando num potencial envolvimento de populações produtoras de granzima B no desenvolvimento de irAEs em CPNPC, dadas as diferenças observadas tanto nas populações demarcadas, quanto em leucócitos viáveis totais (Figura 15E), optamos por avaliar de maneira estatística a frequência das principais populações entre os grupos de estudo com os dados da análise direcionada.

A fim de confirmar o achado obtido no UMAP e determinar quais populações poderiam estar expressando mais granzima naqueles pacientes *Severe*, utilizamos análises direcionadas em diversos componentes imunes. Identificamos, portanto, o aumento dessa enzima nas populações de TCR $\alpha\beta$ (CD5+TCR $\gamma\delta$ -), TCR $\gamma\delta$ (CD5+TCR $\gamma\delta$ +), NK (CD5-CD56+) e linfócitos T CD8 (CD5+CD8+CD4-), com destaque para linfócitos T CD8 efetores (CCR7-CD45RO-), caracteristicamente, linfócitos T CD8 citotóxicos (Figura 16).

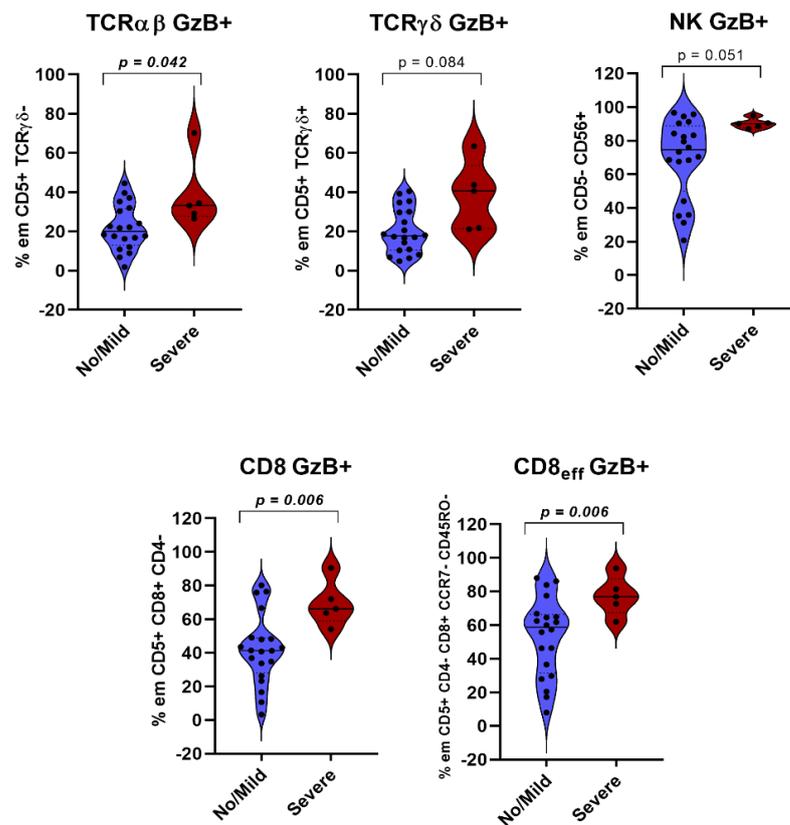


Figura 16 – Expressão diferencial de Granzima B nas populações imunes em CPNPC. Avaliamos expressão de granzima B em diferentes componentes imunes e testamos a diferença entre os grupos sem toxicidade (n=20) e toxicidade (n=5), considerando como diferença estatística $p < 0.05$ e $p < 0.1$ como tendência.

Além da expressão de granzima B aumentada em *Severe*, principalmente na população de linfócitos T CD8, retornamos à avaliação para a população de linfócitos T CD4 que se encontra aumentada em pacientes *No/Mild*. Consideramos que, diante do aumento de citotoxicidade no grupo com toxicidades graves, aprofundar nessa população permitiria compreender melhor um possível balanço entre citotoxicidade e mecanismos reguladores naqueles pacientes que não desenvolvem irAEs. Diante disso, avaliamos a expressão de receptores associados aos perfis auxiliares de linfócitos T CD4 (CXCR3 – Th1; CRTH2 – Th2; CCR6 – Th7 e Th22).

Por meio das análises direcionadas, nota-se que pacientes G0-G2 possuem aumento da expressão de CRTH2 em linfócitos T CD4, indicativo de linfócitos de perfil Th2, mas também em linfócitos T CD8, indicativo de Tc2 (Figura 17A). Tendo em vista que as populações identificadas indicam resposta alternativa, devido principalmente à presença de CRTH2, e que

essa podem produzir a citocina supressora IL-10, avaliamos se havia diferença na expressão dessa citocina em linfócitos T CD4 e CD8, no entanto não observamos diferença estatística (Figura 17B).

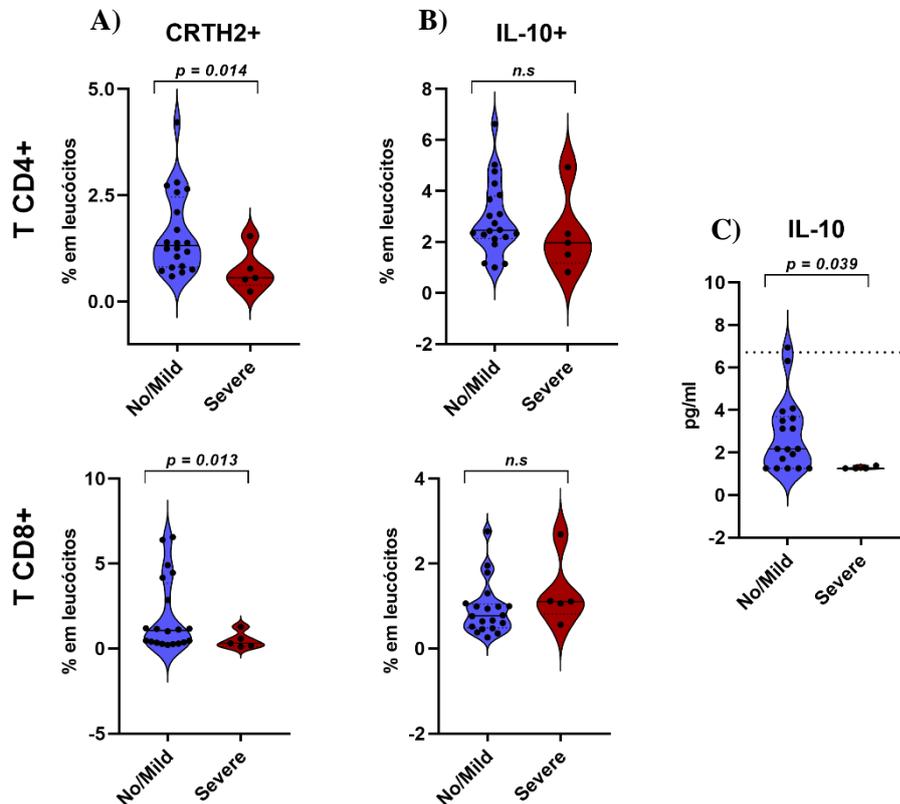


Figura 17 – Parâmetros imunoreguladores restritos a pacientes *No/Mild* em CPNPC. (A) Avaliamos a expressão do receptor CRTH2 em linfócitos T CD4 e T CD8 totais (B) bem como a expressão de IL-10 na mesma população. (C) Dosagem de IL-10 solúvel (pg/ml) no plasma de pacientes *No/Mild* (n=18) e *Severe* (n=4). Para comparação, destacamos pelo tracejado a mediana da dosagem de IL-10 de indivíduos saudáveis sob as mesmas condições experimentais. Em todas essas análises foi considerado como diferença estatística $p < 0.05$ e $p < 0.1$ como tendência.

Quando seguimos para avaliação dos analitos solúveis, retiramos inicialmente os *outliers* identificados pelo teste de ROUT, e ao compararmos a dosagem de IL-10 (pg/mL) entre o desenvolvimento ou não de toxicidades imunomediadas graves, aqueles pacientes sem toxicidade grave apresentam maiores concentrações dessa citocina imunossupressora (Figura 17C).

Além do compartimento celular linfóide, identificamos, em CPNPC, não só uma maior frequência de monócitos intermediários (CD11b+CD14+CD16+), mas também um aumento

na produção de TNF- α nessa mesma população nos pacientes com irAEs G3-G4 (Figura 18), corroborando um balanço favoravelmente imunossupressor em quem não apresenta toxicidade, ao passo que esse balanço se inverte em outro favoravelmente inflamatório e citotóxico naqueles pacientes acometidos por toxicidade imunomediada grave.

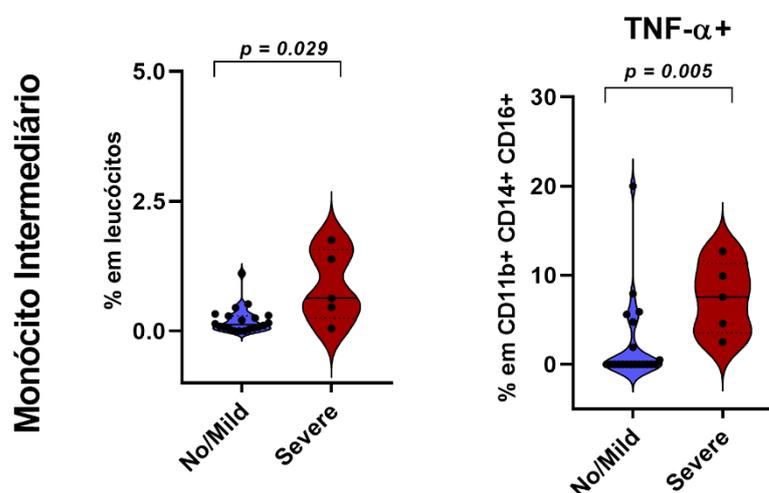


Figura 18 – Compartimento mieloide indica perfil pró-inflamatório em *Severe*. (A) Evidenciamos a diferença entre *No/Mild* (n=20) e *Severe* (n=5) na população de monócitos intermediários e, também (B) a expressão de TNF- α nessa mesma população. As frequências foram comparadas pelo método de Mann-Whitney e foi considerado como diferença estatística $p < 0.05$ e $p < 0.1$ como tendência.

Tendo em vista o balanço identificado na coorte de CPNPC composto por TCR $\alpha\beta$ GzB+, T CD8_{eff} GzB+ e monócitos TNF- α + relacionados ao desenvolvimento de irAEs, enquanto T CD4, T CD4 CRTH2+ e IL-10 solúvel associados a uma possível proteção para os quadros de inflamações extratumorais ocasionadas pelos inibidores de *checkpoints*, utilizamos da regressão logística univariada e multivariada no intuito de identificarmos possíveis parâmetros candidatos a biomarcadores, tendo como referência a coorte G0-G2 e o desfecho de interesse os graus G3-G4.

Realizamos, portanto, diante do balanço inflamatório/supressor, a regressão logística univariada dos componentes identificados na citometria de fluxo e pela dosagem de analitos solúveis (Tabela 3). Dentre esses parâmetros, avaliamos não só o *odds ratio*, mas também o intervalo de confiança do mesmo, a área abaixo da curva e o valor de p.

Tabela 3 – Análises univariadas das populações imunes e citocina em CPNPC

	AUC	OR	95% IC	<i>p-value</i>
CD4	0,850	0,916	0,815 - 0,998	0,043
CD4 CRTH2+	0,830	0,061	0,001 - 0,666	0,013
IL-10 solúvel	0,826	0,009	0,000 - 0,5911	0,007
CD8	0,585	1,029	0,897 - 1,164	0,649
CD8 GzB+	0,850	1,081	1,018 - 1,183	0,007
CD8eff GzB+	0,810	1,081	1,012 - 1,197	0,065
TCR$\alpha\beta$ GzB+	0,800	1,101	1,015 - 1,263	0,018
Intermediário TNF-α	0,860	1,198	1,000 - 1,532	0,082

Legenda: AUC: área abaixo da curva; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; p-value: valor de p, sendo considerado estatístico $p < 0,05$ (em negrito).

Ressaltamos aqueles parâmetros cujos valores de p demonstraram ser significativos ou tendência e que, também, possuíam o intervalo de confiança da razão de chance o mais restrito possível, a saber: linfócitos T CD4, CD8 GzB+, CD8eff GzB+ e TCR $\alpha\beta$ GzB+ e monócitos intermediários TNF- α +. Com essas populações celulares, seguimos para uma análise de regressão logística multivariada com combinação dessas dois a dois.

Dentre todas as combinações realizadas, destacamos como melhores modelos preditivos a combinação de linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8 efetores GzB+ e, também, linfócitos T CD4 e monócitos intermediários TNF- α (Figura 19A).

Esses modelos foram definidos como melhores levando em conta não só a área abaixo da curva e valor de p, mas também, a capacidade desse modelo em melhorar a razão de chance dos parâmetros utilizados quando comparados à regressão univariada, seu poder de predição positivo e negativo e, por fim, seu valor de p no teste de Hosmer–Lemeshow.

A combinação entre T CD4 e linfócitos T CD8 efetores GzB+ retornou uma razão de chance de 0,87 e 1,09, respectivamente, com um poder de predição positiva de 75,00% e de predição negativa de 90,48%, como evidenciado no gráfico “*predicted vs. observed*”. Pelo teste de Hosmer-Lemeshow o valor de $p = 0,64$ não rejeita a hipótese nula o que indica que o modelo é correto para predição de desenvolvimento de irAEs em CPNPC.

Adicionalmente, a combinação entre T CD4 e monócitos intermediários TNF- α demonstrou uma razão de chance de 0,90 e 1,23, respectivamente, e poder de predição iguais aos do modelo anterior, onde pelo teste de Hosmer-Lemeshow, também é caracterizado como um bom modelo na predição do desenvolvimento ou não de toxicidades graves.

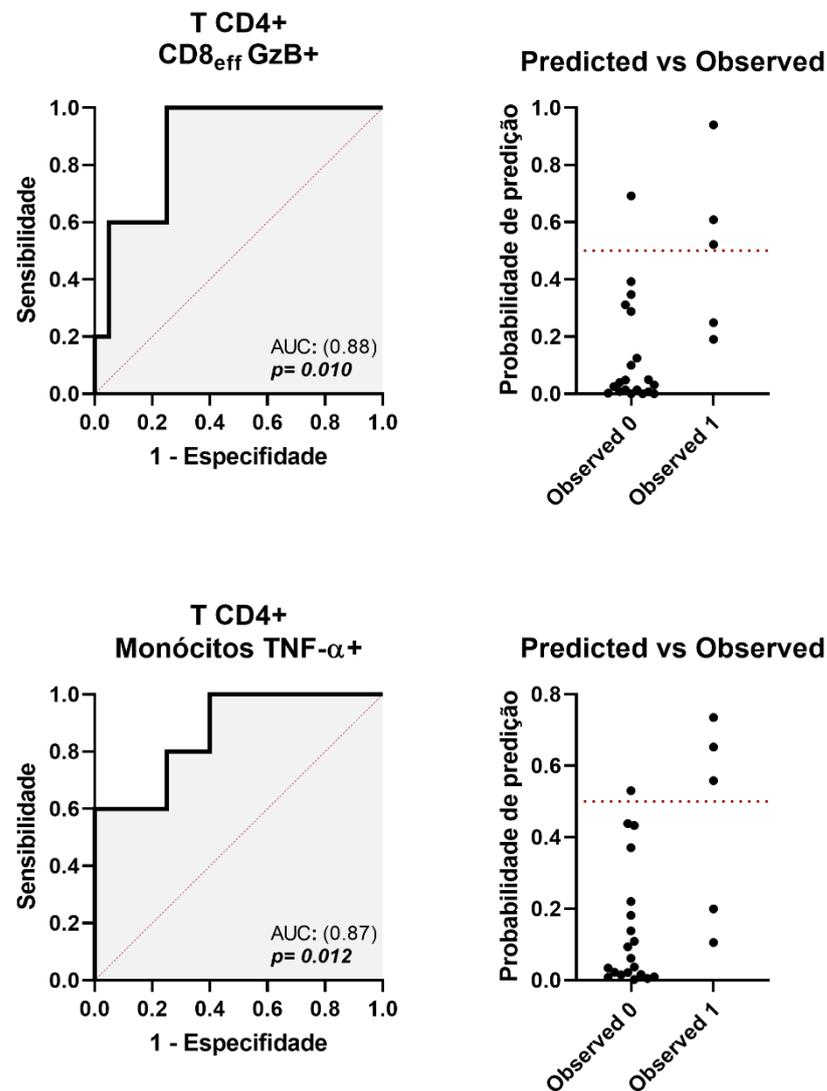


Figura 19 - Modelos multivariados para predição de irAEs em CPNPC. Por meio da regressão logística multivariada, utilizamos os principais parâmetros observados na avaliação univariada para determinar, em conjunto, o poder deles em discriminar os pacientes em *NoMild* (n =20) e *Severe* (n =5), pela curva ROC obtivemos a área abaixo da curva (AUC) e o *p-value* ($p < 0,05$). Para avaliação do modelo, apresentamos o gráfico de predição, sendo *Observed 0* (*NoMild*) e *Observed 1* (*Severe*). Para essa classificação de predição é considerado como *cut-off* de classificação 50% (linha tracejada).

Por fim, nossos resultados para a coorte de CPNPC apontam para um possível balanço inflamatório e citotóxico favorável em pacientes com toxicidades graves representados, principalmente, pela maior produção de granzima B em linfócitos T CD8+ efetores, enquanto a maior frequência de linfócitos T CD4 e maior concentração de IL-10 solúvel direcionam a balança para um cenário mais imunorregulador, o que conferiria uma maior proteção aos pacientes no que diz respeito aos desenvolvimento de eventos adversos imunomediados G3 e G4.

5.4. Vias imunológicas envolvendo TNF- α e IFN- γ são associadas ao desenvolvimento de irAEs grave, em ambos os tumores, anteriormente ao início da imunoterapia com inibidores de *checkpoints*

Considerando a identificação de um biomarcador ou a caracterização de um mecanismo que seja comum entre os diferentes tipos de tumores elegíveis à imunoterapia, optamos por avaliar também as populações imunes e analitos solúveis de maneira integrada e não específica a um único tipo tumoral. Todos os dados do *baseline* da coorte total de 48 pacientes foram agrupados como descrito anteriormente em pacientes *No/Mild* (n=39) e *Severe* (n=9).

Cientes que esses tumores diferem entre si no que diz respeito à patologia, imunologia e no tipo de tratamento, optamos por representar diferencialmente cada tipo tumoral nos gráficos subsequentes pelos pontos totalmente preenchidos, referentes à melanoma (n=23), e os pontos sem preenchimento referentes à CPNPC (n=25), viabilizando a identificação de algum resultado que direcionassem para algum tumor específico e que, conseqüentemente, não se enquadrasse na análise conjunta proposta.

Tomando como ponto de partida os dados de citometria de fluxo multiparamétrica e tendo em vista que se trata de um *big data*, dado número de amostras, número de marcadores totais utilizados e as possíveis combinações entre eles, iniciamos toda a avaliação por meio de análises principalmente não direcionadas e não supervisionadas com base nos dados concatenados de todos os pacientes.

Como descrito em “4.4.1 Análises de dados citometria de fluxo multiparamétrica”, elaboramos a redução dimensional a partir de leucócitos viáveis e reduzimos todas as amostras de todos os pacientes a 2000 células, de modo que aqueles pacientes que não possuíam esse montante foram retirados das análises não direcionadas.

A partir de 42 amostras, sendo 33 *No/Mild* e 9 *Severe*, plotamos o UMAP incluindo ambos os tumores e levando em consideração todos os marcadores presentes no painel intracelular e derivamos dele um UMAP para cada um dos grupos de estudo (Figura 20A).

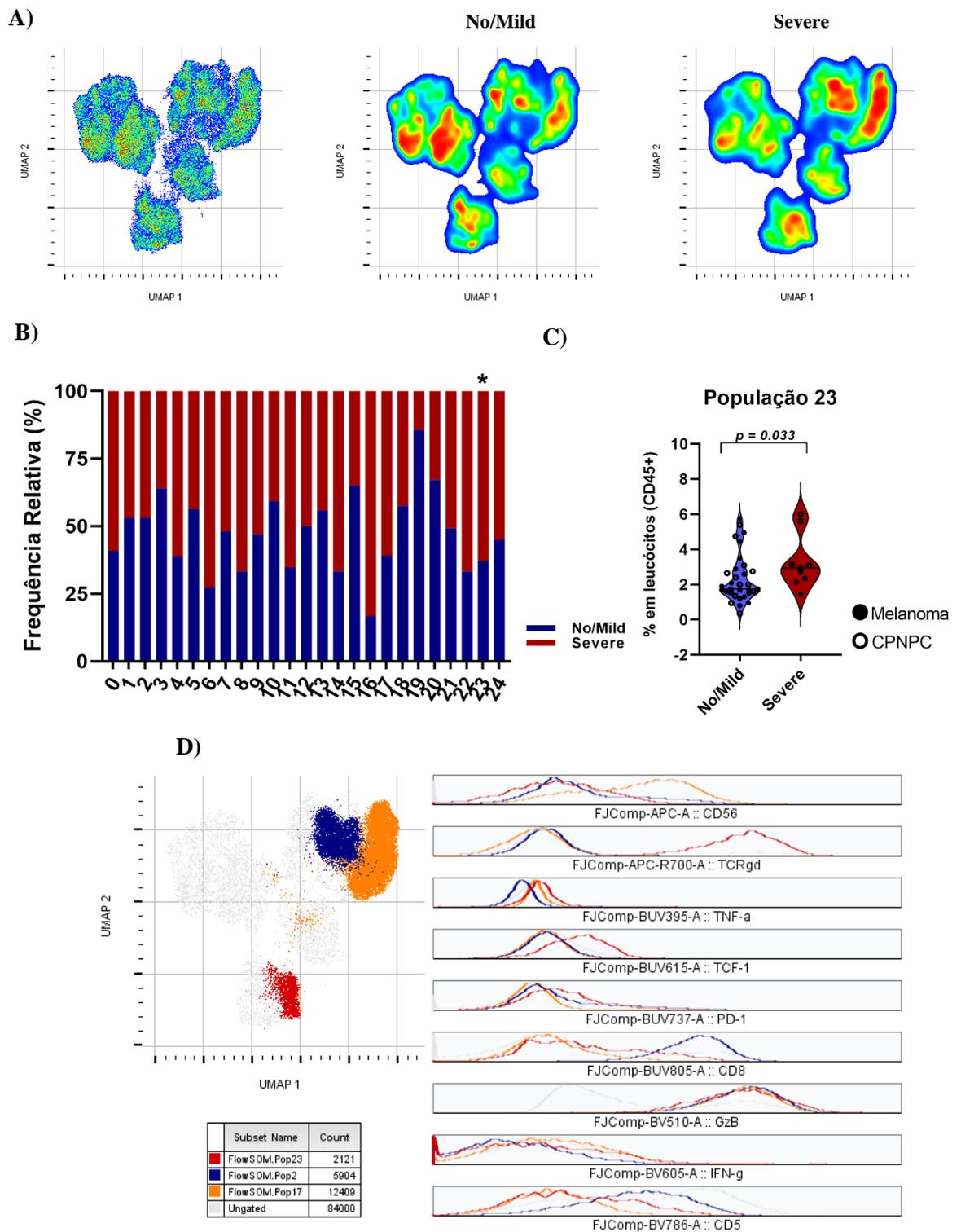


Figura 20 – Análises não supervisionada dos dados de citometria na coorte combinada. **(A)** Com dos dados de 42 pacientes (No/Mild=33; Severe=9) realizamos a redução de dimensionalidade UMAP com todos os marcadores do painel intracelular e derivamos os UMAPs (*smooth pseudocolor*) de cada um dos grupos de estudo **(B)** Populações identificadas pelo FlowSOM e representados suas respectivas medianas de cada um dos grupos. **(C)** Aquela população com diferença estatística pelo teste de Mann-Whitney foi representada com (*) e ao lado direito pelo *boxplot* correspondente. **(D)** As populações com expressões diferenciais pelo UMAP foram caracterizadas pelos histogramas.

Em uma análise visual e comparativa dos UMAPs é possível perceber alguns clusters diferencialmente presentes entre os grupos de estudo. Reforçamos que, diante de grupos experimentais desiguais (*No/Mild* n=33; *Severe* n=9), focamos, principalmente nas populações características de *Severe*. Para reforçar o achado visual, recorremos ao FlowSOM, conforme descrito em “4.4.1 Análises de dados citometria de fluxo multiparamétrica”, e distinguimos 25 populações em nossa coorte (Figura 20B).

De todas as populações, apenas a população 23 apresentou diferença estatística significativa (Figura 20C). A fim de caracterizarmos tanto a população quanto aquelas populações diferencialmente presentes visualmente no UMAP, caracterizamos por histograma os seguintes componentes imunes: **População 2** - CD8+ GzB+; **População 23** - TCR $\gamma\delta$ + TCF-1+ PD1^{low} IFN- γ ^{low} TNF- α + GzB+ e **População 17** - CD56+ GzB+ (Figura 20D). A expressão de granzima B é característica comum a todas as populações apontadas e, especificamente na população 23 (Figura 20D), é um aumento direcionado para o CPNPC, como esperado mediante resultados obtidos na coorte específica desse tumor.

Ainda que a expressão de granzima esteja associada caracteristicamente à CPNPC, nos atentamos para a expressão também dos demais marcadores presentes em nosso painel que estivessem correlacionados entre si e pudessem contribuir para a compreensão de mecanismos imunes ou biomarcadores gerais ao desenvolvimento de irAEs.

Visto que o painel intracelular possui diversos marcadores de ativação e também supressão, recorremos ao STRING para determinar possíveis relações entre cada um dos marcadores presentes (Figura 21A). Nessa avaliação utilizamos os genes referentes a cada um dos marcadores e determinamos correlações com base em citações na literatura, co-ocorrência ou co-expressão. Nessa análise, à exceção de TOX e TCF7 que não se correlacionam com nenhum outro gene da rede, destacamos à interação entre todos os demais marcadores.

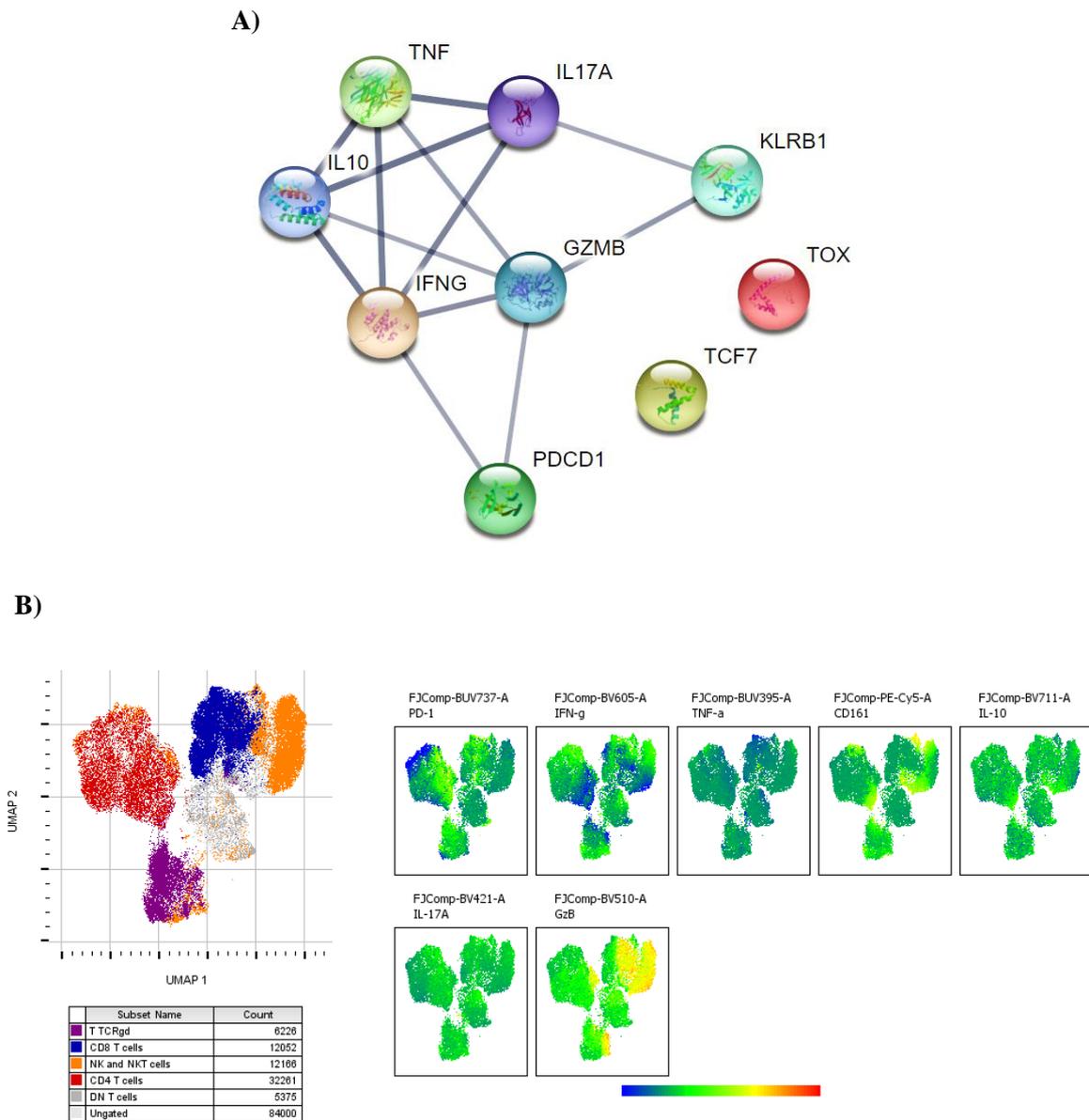


Figura 21 – Rede de interação dos marcadores de ativação e supressão e sua expressão diferencial em ambos os tumores. **(A)** Elaboramos a rede de interações pelo STRING com base em citações na literatura, co-ocorrência e/ou co-expressão, com força de correlação acima de 0,700 utilizando para tal todos os genes referentes aos marcadores de ativação e supressão presentes no painel intracelular. **(B)** Avaliamos a expressão e localização desses marcadores em nosso UMAP dentro das principais populações imunes.

Para investigar a expressão desses marcadores em nossa coorte, sobrepusemos as principais populações imunes em nosso UMAP e realizamos o *Multigraph Color Mapping* daqueles marcadores presentes na rede de interações. Essa avaliação permite avaliar tanto a expressão quanto a localização desses parâmetros (Figura 21B). Nesse caso, percebemos, além

da alta expressão de GzB+ em linfócitos T CD8, TCR $\gamma\delta$ e células NK, a co-localização e possível co-expressão de marcadores de ativação (IFN- γ , CD161 e discretamente de TNF- α).

Assim, avaliamos de maneira direcionada a expressão desses marcadores nas populações gerais de linfócitos T, a saber: TCR $\alpha\beta$ – caracterizado por exclusão do marcador TCR $\gamma\delta$ – e TCR $\gamma\delta$ + (CD5+TCR $\gamma\delta$ +). Essas populações tendem a um aumento em *No/Mild*, no entanto, o cenário é contrabalanceado pelo aumento dos marcadores de ativação em pacientes *Severe* (Figura 22).

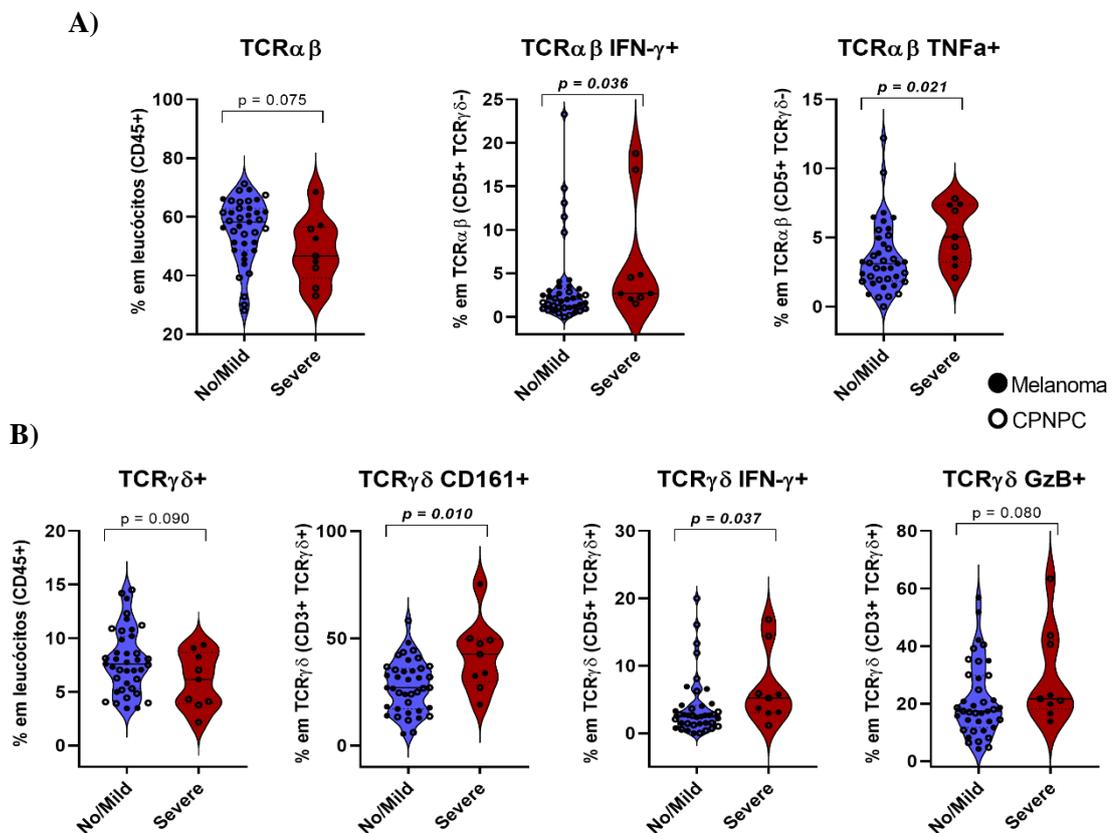


Figura 22 – Expressão de marcadores de ativação em linfócitos T na coorte conjunta. (A) Comparação entre as frequências relativas de TCR $\alpha\beta$ (CD5+ TCR $\gamma\delta$ -) e seus marcadores de ativação (B) Comparação entre as frequências relativas de TCR $\gamma\delta$ (CD5+ TCR $\gamma\delta$ +) e os marcadores de ativação significativos. Foi considerado como significância estatística $p < 0,05$ e tendência $p < 0,1$. Nessa análise englobamos a coorte total de 48 pacientes (*No/Mild*=39; *Severe*=9).

Em TCR $\alpha\beta$ (CD5+ TCR $\gamma\delta$ -), nota-se um aumento na expressão de IFN- γ e TNF- α em pacientes *Severe* quando comparados a *No/Mild* (Figura 22A), enquanto que no compartimento de linfócitos TCR $\gamma\delta$ + observamos o aumento igualmente de IFN- γ , mas não de TNF- α , porém, atrelado ao aumento de CD161 e GzB (Figura 22B). Essa população em específico é parcialmente derivada da população 23 demonstrada na Figura 20C. A caracterização dessas

populações aponta para a relevância dessas moléculas para o desenvolvimento de eventos adversos imunomediados.

Para avaliar a expressão de IFN- γ e TNF- α , evidenciados em TCR $\alpha\beta$ e TCR $\gamma\delta$, seguimos para avaliação da expressão desses marcadores nas populações imunes mais específicas (Figura 23).

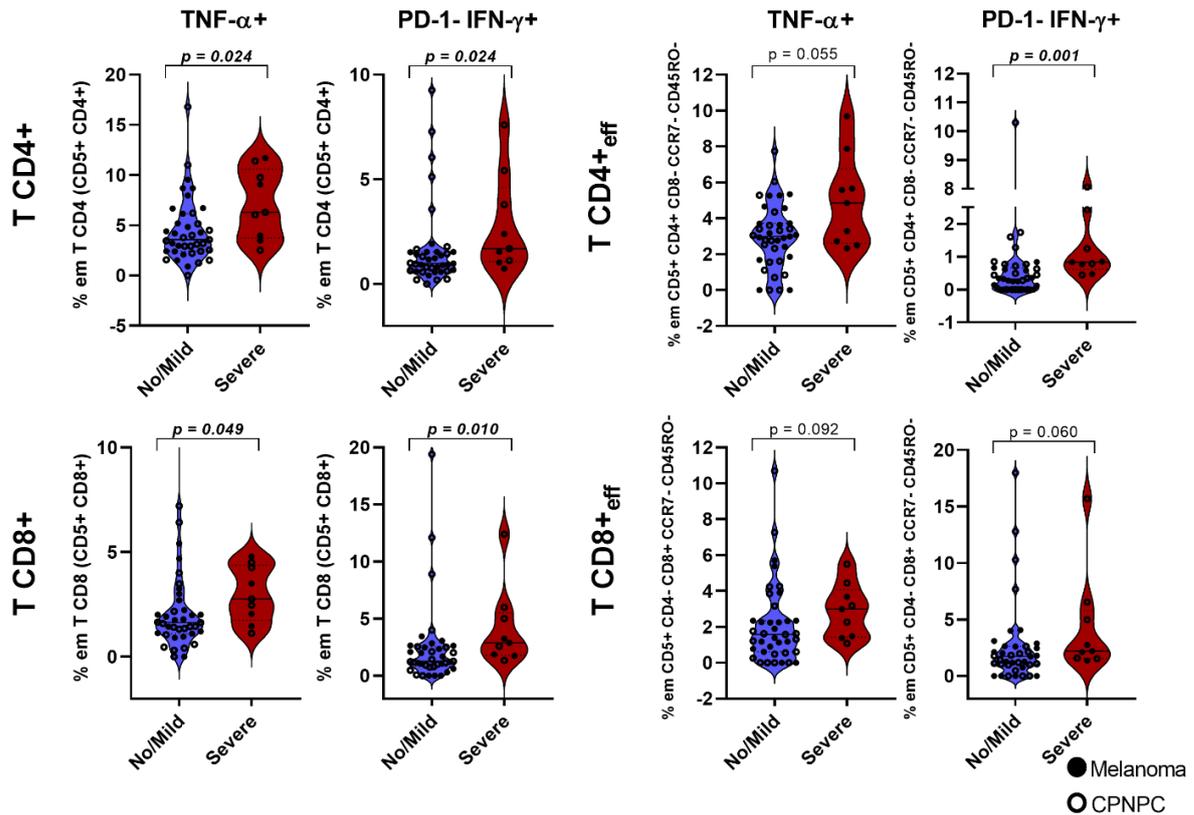


Figura 23 – Expressão dos marcadores de ativação em linfócitos T CD4 e CD8 totais e efetores. Comparação entre a expressão de TNF- α e IFN- γ nas populações de linfócitos T CD4 e CD8 e as suas respectivas subpopulações efetoras (CD45RO- CCR7-). Foi considerado como significância estatística $p < 0,05$ e tendência $p < 0,1$. Nessa análise englobamos a coorte total de 48 pacientes (*No/Mild*=39; *Severe*=9).

Linfócitos T CD4 possuem um aumento expressivo e significativo na expressão de TNF- α e IFN- γ , sendo esse último independente da expressão de PD-1, indicando ativação desacompanhada do processo de exaustão. Quando avaliadas a subpopulação efetora (CD45RO- CCR7-), há uma tendência de aumento das populações ativadas em pacientes *Severe*. Esse cenário de aumento de ativação, baseado na expressão de TNF- α e IFN- γ , em pacientes com toxicidades graves se repete nas populações de linfócitos T CD8 e T CD8 efetora.

Todos os dados da citometria de PBMC reunidos evidenciam uma maior produção das citocinas inflamatórias TNF- α e IFN- γ pelas populações imunes após estímulo policlonal no grupo de pacientes *Severe*. Esse achado nos levou à avaliação dessas e outras citocinas inflamatórias presentes no plasma dos pacientes da nossa coorte no mesmo momento em que os PBMCs foram purificados, isto é, no *baseline*. Ressalta-se que em nossa coorte, nem todos os pacientes possuem dosagem de analitos solúveis disponível (n=44).

Inicialmente, após teste de ROUT, os outliers foram retirados e assim, as concentrações (pg/ml) foram comparadas entre *No/Mild* (n=36) e *Severe* (n=8). Ainda que as populações produtoras de TNF- α e IFN- γ tenham demonstrado importante papel naquele grupo com toxicidade, a quantificação dessas citocinas no plasma não retornou diferença estatística entre os grupos (Figura 24A). A fim de identificar um possível perfil imune solúvel característico de cada grupo, avaliamos o perfil das principais citocinas inflamatórias e IL-10 e, mesmo não possuindo diferença estatística, elaboramos o *radar chart* com os valores de mediana de cada citocina por grupo (Figura 24B).

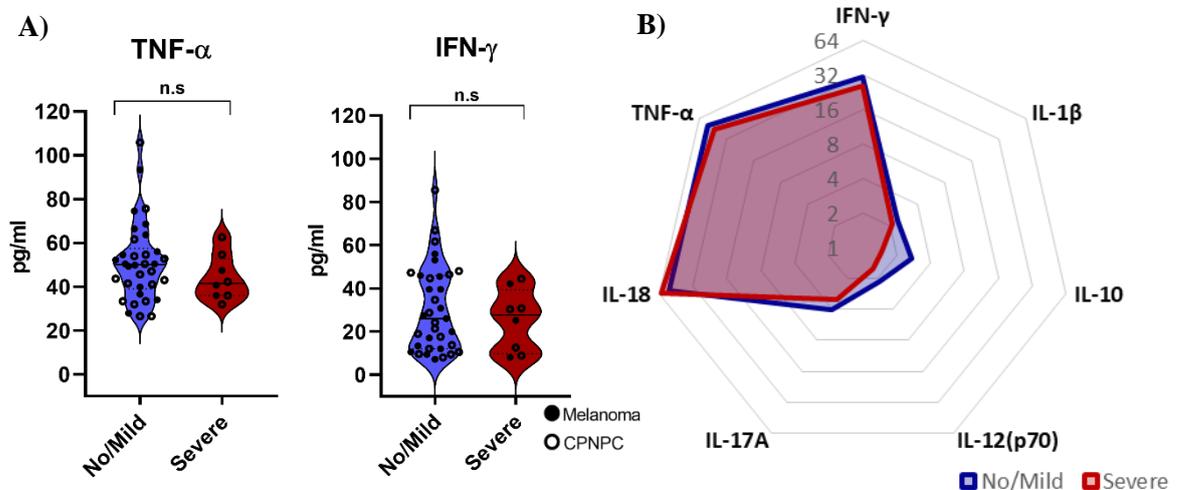


Figura 24 – Dosagem de analitos solúveis e perfil imune solúvel do desenvolvimento de irAEs. (A) Comparação das dosagens de analitos solúveis(pg/ml), TNF- α e IFN- γ , entre pacientes *No/Mild* (n=36) e *Severe* (n=8); n.s = não significativa. (B) *radar chart* das dosagens das principais citocinas inflamatórias e IL-10. Foi utilizado o valor de mediana e a escala do gráfico representada em escala logarítmica de base 2

Pelo *radar chart* é possível perceber um leve direcionamento em pacientes *Severe* para maior dosagem de IL-18, ao passo que *No/Mild* tem direcionamento expressivo para uma maior dosagem de IL-10. Com base nesses resultados, optamos por realizar razões de inflamação (*inflammatory ratio*), na qual dividimos os valores dosados de todas as principais citocinas

inflamatórias pelos valores de IL-10. Essas razões foram representadas, também, pelo *radar chart* da figura 25A.

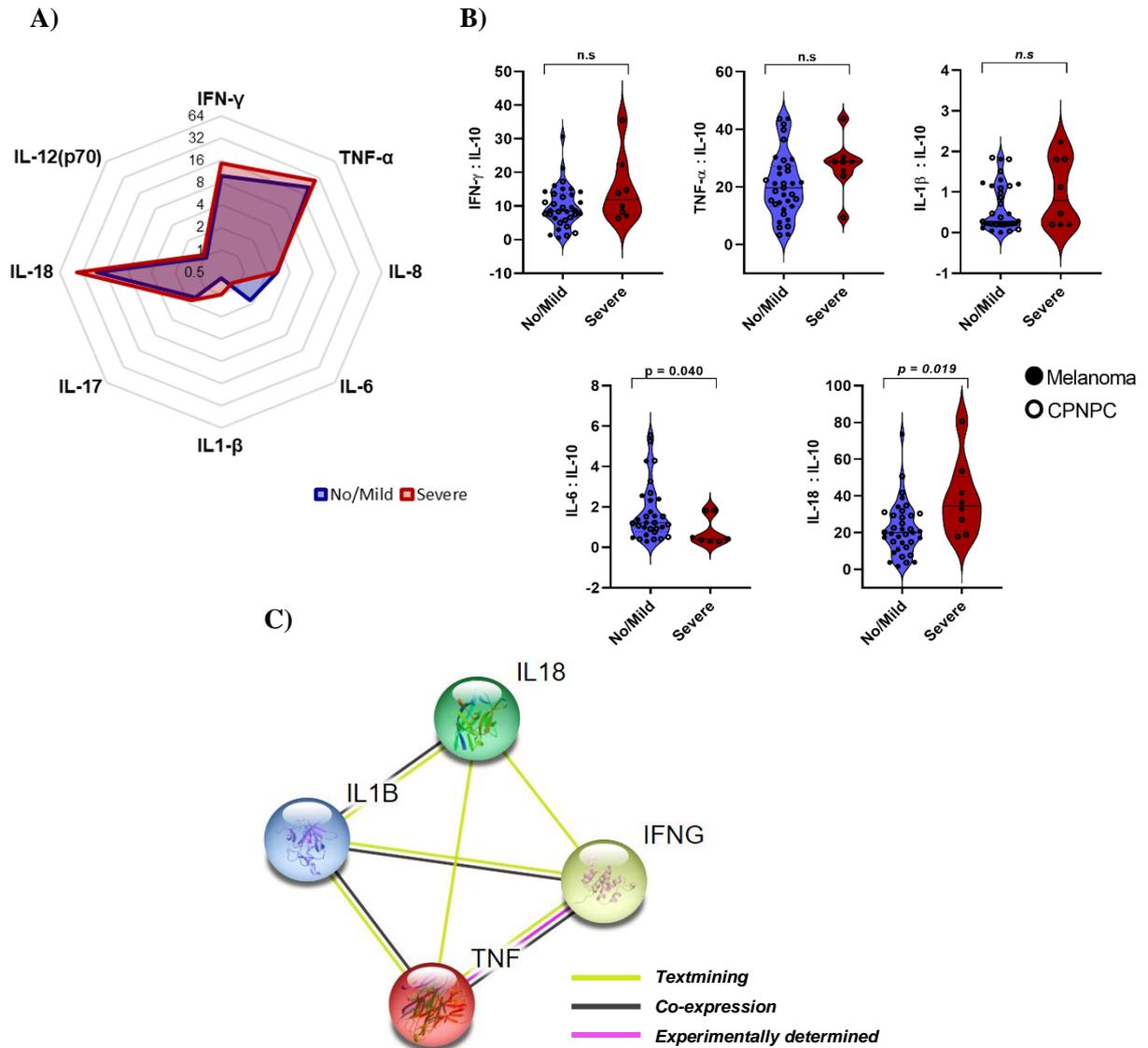


Figura 25 – Razões inflamatórias desempenham papel no estabelecimento de irAEs graves. (A) Desenvolvemos um *radar chart* com base no *inflammatory ratio* entre as principais citocinas inflamatórias e IL-10, sendo representados os valores da mediana e a escala do gráfico representada em escala logarítmica de base 2. (B) As principais razões foram representadas nos *violin plots* onde comparamos os grupos *No/Mild* (n=36) e *Severe* (n=8) e consideramos $p < 0,05$ como diferença estatística, $p < 0,01$ como tendência e n.s representando estatística sem diferença significativa. (C) rede de interações de citocinas, considerando como interações acima de 0.700 de confiança e tendo como parâmetros a menção conjunta na literatura, co-expressão e dados determinados experimentalmente.

Analisando o *radar chart* podemos notar com base na mediana que aqueles pacientes que ao longo da imunoterapia com inibidores de *checkpoints* desenvolvem toxicidades G3 e G4

possuem, antes mesmo do início do tratamento, direcionamento para um perfil de citocinas pró-inflamatório (IL-18, TNF- α , IFN- γ e IL-1 β) em detrimento da IL-10. Quando comparados os grupos do estudo (Figura 25B), notamos diferença estatística em IL-18:IL-10 que se encontra aumentada em Severe, indicando perfil inflamatório, ao passo que em *No/Mild* a razão IL-6:IL-10 está aumentada.

Quando avaliadas as citocinas inflamatórias por meio de uma rede de interações (Figura 25C), observamos que essas possuem fortes interações entre si, evidenciando que possivelmente pertencem a vias em comum e corroborando nossos achados de citometria de fluxo bem como as dosagens de citocinas solúveis.

Pensando na possibilidade de sugerirmos algum desses parâmetros como possíveis biomarcadores para o desenvolvimento de eventos adversos imunomediados em ambos os tumores, realizamos, inicialmente, análises de regressão logística univariadas dos principais parâmetros celulares TNF- α + e IFN- γ + e a razão IL-18:IL-10 e representamos no *forest plot* aquelas que retornaram área abaixo da curva significativa ($p < 0,05$) e acima de 0,70 (Figura 26).

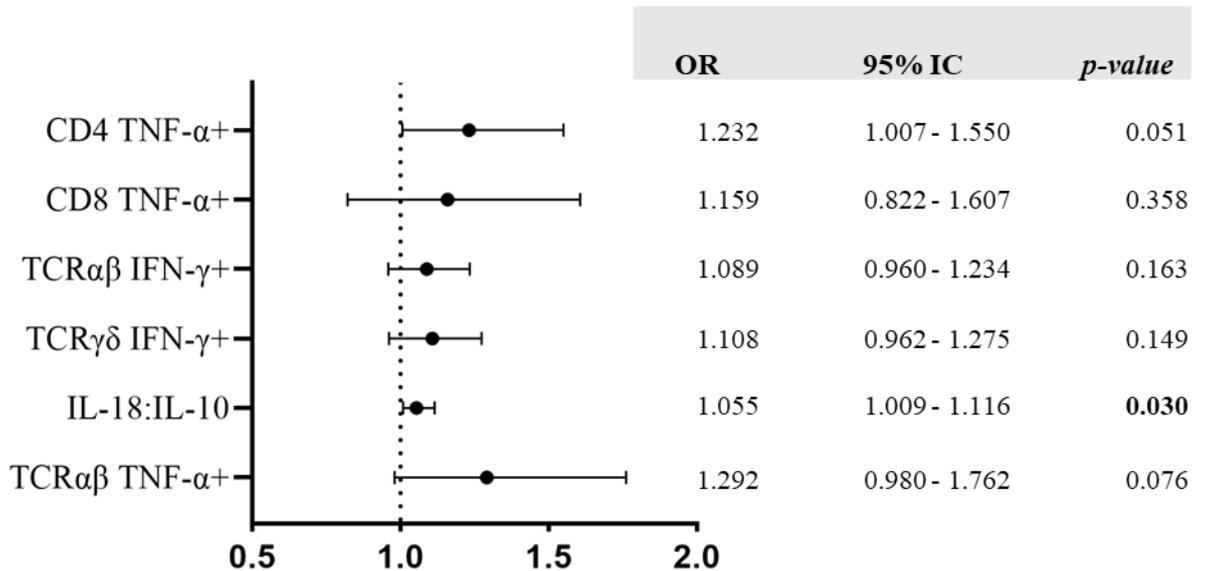


Figura 26 – *Forest plot* referente às regressões logísticas univariadas em ambos os tumores. *Forest plot* representando a razão de chance (ponto) e seus valores mínimo e máximo, considerando intervalo de confiança de 95%. OR: razão de chance (*odds ratio*); IC: intervalo de confiança; *p-value*: valor de p considerado como estatístico quando menor que 0,05 (negrito).

Observamos, que dentre os parâmetros, apenas a razão IL-18:IL10 apresentou razão de chance significativa e TCR $\alpha\beta$ TNF- α + e CD4 TNF- α + uma tendência ($p < 0,01$).

Os parâmetros foram, em seguida, submetidos à regressão logística multivariada. De todos os modelos testados (sempre limitadas a no máximo 4 variáveis independentes), aquele

que melhor se adequou à predição de eventos adversos, atrelando parâmetros estatístico como o teste de Hosmer-Lemeshow, boa área abaixo da curva (acima de 0,7), valor de p ($p < 0,05$) e poder de predição negativa e positiva razoáveis, foi a combinação de $\text{TCR}\alpha\beta$ $\text{TNF-}\alpha^+$ com a razão inflamatória IL-18:IL-10 (Figura 27).

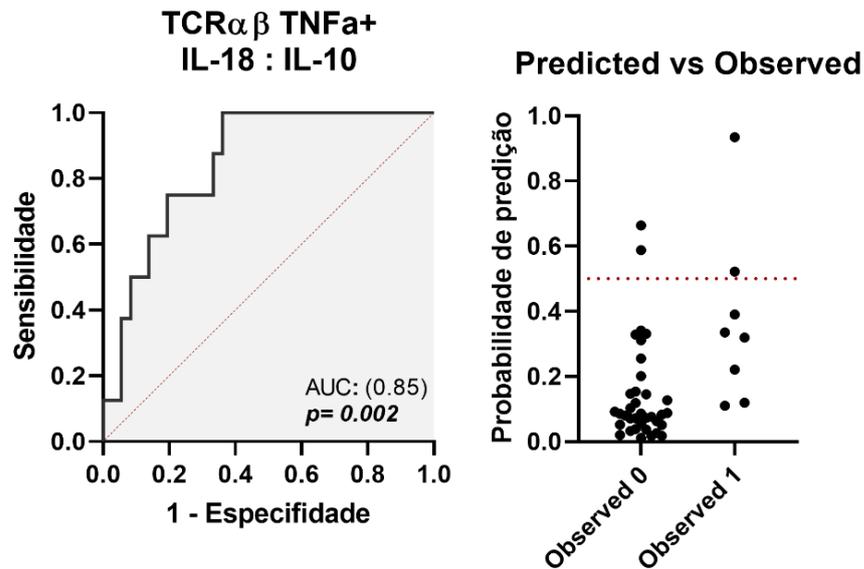


Figura 27 - $\text{TCR}\alpha\beta$ $\text{TNF-}\alpha^+$ e razão IL-18: IL-10 como modelo de predição de irAEs em ambos os tumores. Pelo modelo de regressão logística multivariada a combinação $\text{TCR}\alpha\beta$ $\text{TNF-}\alpha^+$ e razão IL-18:IL-10 foi a que melhor se adequou como modelo preditivo de irAEs na coorte com ambos os tumores. Demonstramos, portanto a curva ROC com sua área abaixo da curva (AUC) e o p -value ($p < 0,05$) descritos no gráfico. Para avaliação do modelo, apresentamos o gráfico de predição, sendo *Observed 0* (*No/Mild*) e *Observed 1* (*Severe*). Para essa classificação de predição é considerado como *cut-off* de classificação 50% (linha tracejada)

Nesse modelo, a razão de chance de $\text{TCR}\alpha\beta$ $\text{TNF-}\alpha^+$ é de 1,40 com intervalo de confiança de 95% igual a 1,014 a 2,06, enquanto a razão para IL-18:10 é de 1,067 com intervalo de confiança de 1,014 a 1,14. Em ambos os casos houve aumento da razão de chance de ocorrência de toxicidades imunomediados, sendo esses parâmetros, portanto, predisponentes ao seu desenvolvimento. A regressão logística apresentou poder preditivo negativo de 85% e positivo de 50% além de um valor de p que pelo teste de Hosmer-Lemeshow que considera o modelo correto para predição do desfecho.

Por fim, no intuito de agregar todos os parâmetros identificados como importantes para predição de eventos adversos, tanto a nível tumor-específico (Melanoma e CPNPC) quanto de modo geral (ambos os tumores), buscamos possíveis interações entre todos os parâmetros de cada uma das vertentes de nosso estudo por meio da plataforma STRING (Figura 28A).

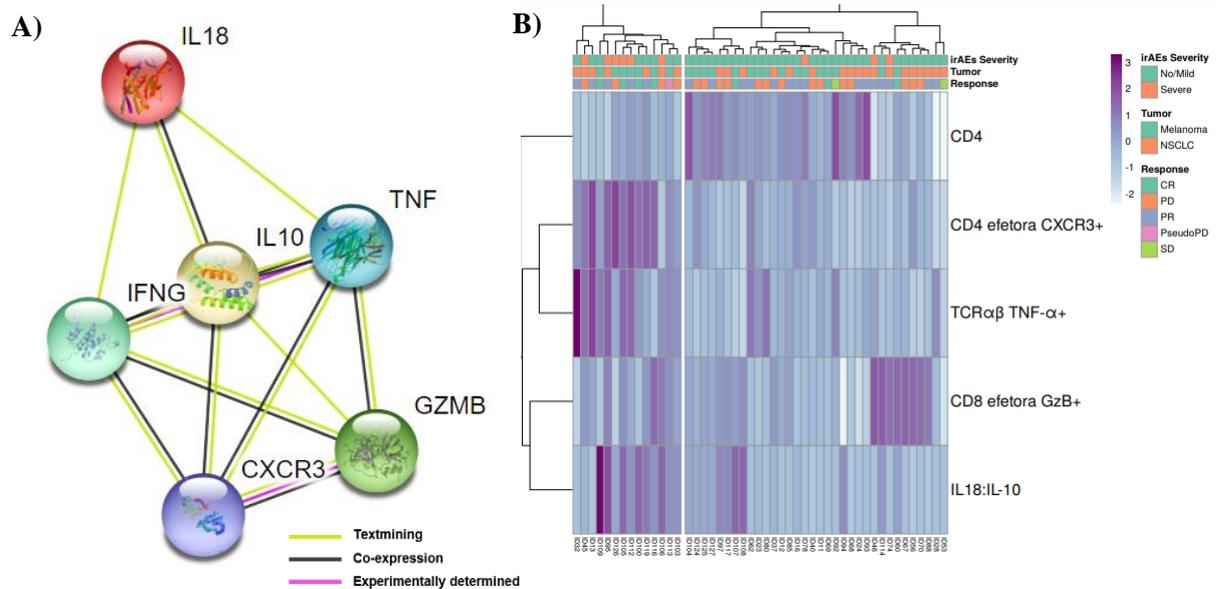


Figura 28 – Rede imunológica envolvida no desenvolvimento de irAEs grave capaz de ser detectada anteriormente ao início da imunoterapia. **(A)** Rede de interações para predição de possíveis associações entre os candidatos a biomarcadores tanto a nível tumor-específico quanto na análise combinada, tomando como grau de confiança da predição de 0,7. **(B)** *heatmap* para validação da rede imunológica predita pelo STRING, utilizando toda a coorte de pacientes, *No/Mild* ($n=39$) e *Severe* ($n=9$), e clusterizando com base no método Euclidian para clusterização.

A partir dessa análise, podemos identificar que todos os parâmetros identificados como possíveis candidatos a biomarcadores em melanoma (CD4eff CXCR3+), CPNPC (CD4 total e CD8eff GzB+) ou na análise conjunta (TCR $\alpha\beta$ TNF- α + e razão IL-18: IL-10) estão concentrados numa via em comum. Sendo assim, plotamos um *heatmap* (Figura 28B) com toda a coorte ($n=48$) no intuito de validar essa interação entre os candidatos a biomarcadores.

Dentre os pacientes com eventos adversos graves, 6 de 9 segregam num mesmo grupo, caracterizado principalmente pelo enriquecimento de todos os parâmetros, exceto a frequência de linfócitos T CD4, que caracteriza o grupo restante majoritariamente *No/Mild*, à exceção de 3 pacientes com toxicidade grave que, no entanto, possuem ao menos um parâmetro característico de irAEs aumentado, a saber, o CXCR3 (ID78 - Melanoma) e a granzima B (ID46 e ID74 – ambos diagnosticados com CPNPC).

Em suma, a avaliação realizada com ambos os tumores demonstrou que ao avaliarmos pacientes com melanoma e CPNPC tratados com imunoterapia de inibidores de *checkpoints*, a rede imunológica envolvendo populações produtoras de TNF- α , IFN- γ e a razão entre IL-18 e IL-10 solúveis estão associadas ao desenvolvimento de toxicidades imunomediadas graves. E

quando avaliado em conjunto com os parâmetros tumor-específicos, os candidatos a biomarcadores estão conectados em uma mesma via imunológica.

6. DISCUSSÃO

Identificar biomarcadores e/ou vias imunes associadas ao desenvolvimento de eventos adversos imunomediados vem se tornando cada vez mais relevante diante da crescente utilização da imunoterapia de inibidores de *checkpoints* em diferentes tipos tumorais, em diferentes estágios da doença e linhas de tratamento. Tendo em vista esse cenário, nosso trabalho buscou, por meio da caracterização de populações imunes e citocinas/quimiocinas anteriormente ao início da imunoterapia, identificar mecanismos-chaves possivelmente envolvidos no desenvolvimento de toxicidade e sugerir possíveis biomarcadores desse desfecho clínico.

Nosso estudo, de caráter prospectivo e não intervencionista, contou com uma coorte total de 48 pacientes oncológicos tratados no A.C Camargo Cancer Center e que receberam imunoterapia com inibidores de *checkpoints* imunológicos, incluindo anti-PD-1 e anti-CTLA-4. Desse total, 23 pacientes foram diagnosticados com melanoma (estadiamentos III e IV) e 25 com CPNPC (estadiamentos IV, IIIB e IIC). A partir da avaliação clínica em conformidade com o CTCAE versão 5.0⁶¹ os pacientes foram classificados de grau 0 até grau 4 e posteriormente agrupamos aqueles pacientes sem toxicidade relatada ou com toxicidades leves em pacientes *No/Mild* (G0 – G2; n=39) e aqueles com toxicidades clinicamente relevantes, com limitações de autocuidado e com possíveis risco à vida dos pacientes foram agrupados em *Severe* (G3 – G4; n=9).

Como abordagem metodológica, optamos por avaliar dois principais cenários: aquele tumor-específico com os tipos tumorais segregados e um cenário agrupando ambos os tumores que englobou tanto melanoma quanto CPNPC. Ao segregarmos por tipo tumoral, lidamos com uma limitação estatística referente ao tamanho amostral que reduz bastante nossa capacidade de comparação entre os grupos e também nosso poder de predição. No entanto, nos casos relatados ao longo desse estudo, quando avaliados os tumores separadamente, ressaltamos que por se tratar de um estudo exploratório e prospectivo, as diferenças entre as medianas fortalecem nossos achados, mesmo estando cientes da necessidade do aumento do número de pacientes nas coortes para futura validação.

Considerando o desenvolvimento de eventos adversos imunomediados graves, contamos com uma coorte de 4 pacientes com melanoma e 5 pacientes com CPNPC. Quando avaliados os parâmetros qualitativos (sexo, estadiamento, imunoterapia e resposta) nenhum deles retornou, pelo teste exato de Fisher, associação com o desfecho de interesse. Contrapondo a esses resultados, estudos clínicos, estudos de revisão sistemática e meta-análises vêm demonstrando, em largas coortes, possíveis relações entre resposta, tipo de imunoterapia e taxa

de resposta objetiva (do inglês *objective response rate*, *ORR*) com o desenvolvimento de eventos adversos.

Estudo clínico (CheckMate 511) com pacientes diagnosticados com melanoma irresssecável estadiamentos III ou IV, apresentou em seus resultados de estudo clínico fases IIIB/IV, que a alteração de dosagem de nivolumabe 1 mg/kg e ipilimumabe 3 mg/kg para nivolumabe 3mg/kg e ipilimumabe 1mg/kg reduziu a ocorrência de eventos adversos imunomediados G3-G4 de 47,8% para 33,9% sem, no entanto, impactar significativamente a taxa de resposta objetiva (50,6% e 45,6%, respectivamente; $p=0.35$)⁵⁵, demonstrando que esse esquema de tratamento reduziria os efeitos colaterais do tratamento sem impactar na eficiência do mesmo. Em nossa coorte de melanoma, no entanto, obtivemos uma taxa de 17,39%, que é inferior quando comparado ao Checkmate 511. Com relação ao tempo de desenvolvimento dos irAEs nosso estudo apresentou mediana de 56 dias que está contida na variação presente no CheckMate 511 de 35,7 a 109,9 dias.

No estudo clínico Keynote-189 com coorte de CPNPC metastáticos e virgens de tratamento, sem mutações EGFR ou ALK, tratados em combinação de imunoterapia e quimioterapia (pembrolizumabe+cisplatina/carboplatina+pemetrexede), 10,9% dos pacientes desenvolveram irAEs G3 ou superior quando comparado a 4,5% do grupo placebo+quimioterapia⁵⁸. Quando comparada à nossa coorte, ainda que tenhamos n amostral consideravelmente menor, dentre os pacientes com igual diagnóstico de CPNPC e com mesmo esquema de tratamento identificamos 20% de eventos adversos graves.

Assim, quando avaliamos o desenvolvimento de eventos adversos em nosso estudo, diferentemente do que se esperava com base nos estudos clínicos, nossa coorte de melanoma possui menor taxa de irAEs do que CPNPC, ainda que tenham recebido dois inibidores de *checkpoints* imunológicos, anti-CTLA-4 (ipilimumabe) e anti-PD-1 (nivolumabe).

Quando discutido o uso da imunoterapia com bloqueadores imunológicos, ganha destaque a associação entre a taxa de resposta e o desenvolvimento de eventos imunomediados. Frente a isso, Hussaini e colaboradores⁹⁵ publicaram no ano de 2020 uma revisão sistemática e meta-análise que buscou compreender se o desenvolvimento de toxicidades imunomediadas estava associado a um melhor benefício clínico no que diz respeito ao aumento da sobrevida em tumores sólidos tratados com imunoterapia.

Nesse estudo identificaram que nos grupos melanoma e CPNPC, os pacientes com toxicidade – não houve distinção por grau – possuem maior ORR (considerada a média ponderada) a saber 37,67% versus 23,44% em melanoma e 41,49% versus 18,01% em pulmão. Em nosso estudo, no entanto, não observamos associação alguma entre irAEs e a resposta dos

pacientes. Tal resultado pode ser justificado, além do tamanho amostral inferior, pelo fato de não agruparmos eventos adversos imunomediados como um todo (de G1 a G5), já que diante da dificuldade do diagnóstico e consequente subnotificação de eventos mais brandos, nosso grupo sem eventos adversos (G0) seria enviesado devido a pacientes que tiveram toxicidades G1 e G2 e que não foram notificadas.

Revisitando tanto os estudos clínicos^{51,55,58} quanto a revisão sistemática⁹⁵ discutidos acima, vale ressaltar aqueles eventos adversos que demonstraram maior incidência nas coortes. Quando tomamos os pacientes com melanoma em imunoterapia combinada, no CheckMate 511⁵⁵ destacam-se a diarreia e o aumento da enzima ALT (possivelmente associada ao quadro de hepatite) como as principais toxicidades independente da dosagem do tratamento. Por outro lado, durante o Keynote-189⁵⁸, dentre os eventos adversos considerados de fato imunomediados e classificados como G3-G5 pelos investigadores do estudo clínico, predominam os quadros de pneumonite (3%) e em seguida reações graves da derme (2,2%), nefrite (1,5%) e colite (1,5%). Em ambos os tumores, nossos dados direcionam para o mesmo cenário, onde em melanoma o principal evento adverso imunomediado que caracterizamos foi a hepatite e em CPNPC os quadros imunomediados de pneumonite.

Iniciando nossa caracterização imune, optamos pela avaliação tumor-específica no intuito de buscar vias e/ou marcadores do desenvolvimento de toxicidades graves que estivessem possivelmente atreladas ao tumor, considerando sua fisiopatologia e esquema de tratamento.

Em nossa coorte de melanoma, identificamos, dentre os subtipos de linfócitos T CD4 auxiliares (Th) e T CD8 citotóxicos (Tc)⁹⁴, que os pacientes que desenvolvem eventos adversos graus 3 e 4 possuem um aumento de CXCR3 nas populações de linfócitos T TCR $\alpha\beta$ (CD3+ TCR $\gamma\delta$) e de linfócitos T CD4 efetores (CD3+ CD4+ CD45RO- CCR7-).

CXCR3, do inglês *C-X-C motif chemokine receptor 3*, é um receptor associado à proteína G cujos principais ligantes são o CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (ITAC) e menos expressivamente, o CXCL4 (PF-4). Essa molécula é expressa não só por células imunes, mas também por células endoteliais, tumorais e outras. CXCR3 possui três variantes derivadas do *splicing* do seu gene, CXCR3-A, CXCR3-B e CXCR3-alt. A variante CXCR3-A é a mais bem descrita, e a ligação de um de seus agonistas é capaz de induzir, intracelularmente, vias da MAPK e PI3K/Akt que direcionam principalmente ao aumento de quimiotaxia e proliferação celular. Por outro lado, a ligação de CXCL9/10/11 ao CXCR3-B é capaz, por meio da adenilil ciclase/cAMP/PKA, de induzir apoptose e inibir os processos de proliferação, angiogênese e metástase⁹⁶.

Dentre seus ligantes, observa-se diferença de afinidade de ligação, de modo que CXCL11 tem maior afinidade pelo receptor, e em seguida CXCL10 e CXCL9⁹⁷. CXCL11 é capaz de se ligar antagonicamente ao receptor CCR3 de modo a impedir a interação CCR3-CCL11 e reduzir a resposta de linfócitos Th2⁹⁸, além de induzir a internalização de CXCR3 devido à sua alta afinidade pelo mesmo^{97,99}, sugerindo uma atividade ambígua desse último ligante.

Tanto CXCR3 quanto CXCL9/10/11 são moléculas cuja expressão é induzida por IFN- γ e estão comumente associadas ao processo de polarização de populações de linfócitos T, principalmente T CD4 do tipo Th1, justificando o uso do receptor CXCR3 como um dos marcadores de subsets de linfócitos auxiliares¹⁰⁰.

Em estudo realizado com camundongos e *in vitro*, com validação dos resultados em PBMC humano, Zohar e colaboradores¹⁰¹ demonstraram em encefalomielite autoimune que a ligação de CXCL9 e CXCL10 ao CXCR3 é capaz de induzir a polarização de linfócitos T CD4 a um perfil Th1/Th17, isto é, pró-inflamatório, por meio da fosforilação principalmente de STAT1 e STAT4, aumento da transcrição de T-bet e ROR γ T acompanhado da diminuição da expressão de GATA-3, caracterizando populações CD4+ IL-17high IFN- γ low (Th17) e IFN- γ high IL-4low (Th1). CXCL11, por sua vez, demonstrou contribuir na fosforilação de STAT3 e STAT6, que atrelada à redução da transcrição de ROR γ T, e aumento da expressão de marcadores como LAG-3, caracterizam polarização de populações CD4+ IL10high (Tr1) e IFN- γ low IL-4high (Th2).

Diante da limitação experimental em caracterizar as subpopulações de linfócitos T CD4 de maneira intracelular, ao identificarmos, em nossa coorte, uma maior frequência de linfócitos T CD4 efetores (CD5+ CD4+ CD8- CD45RO- CCR7-) com maior produção de IFN- γ mas não expressando PD-1 – indicando população ativada e desacompanhada do processo de exaustão – recorremos à correlação entre CD4 efetoras CXCR3+ e PD-1- IFN- γ +. Essa demonstrou ser uma correlação moderada e, pautados no envolvimento de CXCR3 e IFN no processo de polarização de linfócitos T CD4, inferimos que pacientes *Severe* possuem maior expressão *baseline* de linfócitos CD4 direcionadas a um possível perfil Th1.

Do ponto de vista do desenvolvimento de toxicidades, o direcionamento dessas populações a sítios não tumorais e com vias de sinalizações supressoras bloqueadas pelos anticorpos empregados na imunoterapia, desencadearia microambientes caracteristicamente pró-inflamatórios que, localmente, poderiam levar à ativação e manutenção de populações imunes efetoras e citotóxicas, conseqüentemente configurando as lesões teciduais que observamos nos irAEs.

Uma vez que nossos resultados apontam para o aumento na população aqui caracterizada como Th1, eles divergem no que esperávamos com relação aos ligantes de CXCR3 (CXCL9 e CXCL10). Em nossa coorte não encontramos diferença de dosagem de CXCL9 e CXCL10 entre os grupos *No/Mild* e *Severe*. Acreditamos, no entanto, que o resultado é plausível quando temos em vista que a dosagem é de momento anterior ao início do tratamento e sem qualquer ativação sistêmica prévia.

Nossos achados são corroborados pelo estudo publicado mais recentemente por Luoma *et al*⁷⁷ onde, por meio de *single-cell RNA sequencing*, caracterizaram populações imunes infiltradas no colón inflamado (colite) de pacientes diagnosticados com melanoma e tratadas com imunoterapia de *checkpoints* imune. Dentre os resultados obtidos, identificaram nas populações mieloides um aumento na expressão de genes induzidos por IFN- γ especialmente CXCL9 e CXCL10 e nas populações de linfócitos T aumento na expressão do gene CXCR3.

Esses resultados reforçam nossos achados, principalmente tendo em vista que se trata de uma coorte experimental semelhante. No entanto, destaca-se que nosso trabalho identificou a diferença de expressão de CXCR3 anterior à terapia e de maneira sistêmica, de modo que, mesmo com limitação de tamanho amostral na coorte para determinação de biomarcadores, apontou a população de linfócitos T CD4 efetores CXCR3+ como candidata a um biomarcador do desenvolvimento de toxicidades graves em pacientes com melanoma tratados com imunoterapia de *checkpoints*.

Tendo como ponto de partida o envolvimento dessa população no estabelecimento dos focos inflamatórios extratumorais, surge a possibilidade do manejo direcionado ao eixo CXCR3. Sabemos, no entanto, que essa abordagem é bastante limitada tendo em vista que esse mesmo eixo é ferramenta-chave da resposta anti-tumoral montada após o uso dos bloqueadores imunológicos¹⁰² e sua supressão impactaria negativamente na taxa de resposta ao tratamento.

Os estudos em questão não debatem, com frequência, o envolvimento direto de CXCL11 nesses casos¹⁰³ e, por ser o ligante com maior afinidade ao receptor, capaz de gerar internalização de CXCR3 atrelada a sua capacidade em polarizar ou até mesmo re-polarizar linfócitos T CD4 naive ou Th1/Th17 num perfil Th2 ou Tr1⁹⁷ caracteristicamente supressores, seu bloqueio no contexto dos eventos adversos imunomediados torna-se inviável, uma vez que deve-se garantir a resposta antitumoral e a internalização do receptor reduziria esse benefício clínico. No entanto, é válido ressaltar que utilizar a via envolvida na polarização de Th2 e re-polarização de linfócitos Th1 e Th17 podem ser revisitadas como possíveis alvos de manejo clínico em paciente com predisposição ao desenvolvimento de irAEs, visando atenuar uma possível exacerbação do eixo de CXCR3.

Quando avaliados aqueles pacientes diagnosticados com CPNPC, os resultados evidenciam diferentes populações envolvidas no desenvolvimento de eventos adversos imunomediados graves. Nessa coorte, a princípio chama atenção o aumento da frequência de linfócitos T CD4 naquele grupo sem toxicidade ou toxicidade leve quando comparados aqueles com toxicidades graves. A fim de melhor caracterizar essa população, buscamos avaliar os receptores característicos dos perfis auxiliares e, também, ainda que não concomitantemente, algumas citocinas intracelulares.

Em nossa avaliação identificamos as populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ expressando o receptor CRTH2, aumentadas em pacientes *No/Mild*, presente em linfócitos Th2 ou Tc2⁹⁴. Ao considerarmos o aumento desses linfócitos auxiliares, buscamos reforçar nossos dados com a dosagem dos analitos solúvel, onde pacientes *Severe* apresentaram valores menores de IL-10 solúvel, indicando uma possível balança imunológica que diferencia aqueles pacientes que desenvolverão ou não alguma toxicidade grave. Nesse contexto, linfócitos T CD4 Th2 produzem classicamente IL-4, IL-5 e IL-13, envolvidos principalmente na resposta imune humoral e geração de resposta alérgica¹⁰⁴, além de serem capazes de produzir IL-10, a qual desempenha potente papel imunossupressor¹⁰⁵, justificando não só a maior dosagem dessa citocina no plasma de pacientes sem toxicidade expressiva mas também esse parâmetro como fator protetor ao desenvolvimento de eventos adversos, dada sua razão de chance obtida na regressão univariada.

Em paralelo à redução de IL-10 solúvel, identificamos também que pacientes com irAEs grave possuem um aumento na produção de granzima B intracelular em diferentes populações celulares, especialmente linfócitos T CD8 efetores, permitindo-nos inferir que após estímulo com anti-CD3 e anti-CD28, pacientes com toxicidade grave possuem maior frequência relativa de linfócitos T CD8 citotóxicos (CD5+ CD8+ CD45RO- CCR7- GzB+).

Linfócitos T CD8 citotóxicos e células NK comumente armazenam em seus grânulos intracelulares perforina e granzima, ambas moléculas citolíticas que, mediante reconhecimento do TCR e sinapse-imunológica, são capazes de induzir danos à membrana por meio da geração de poros, levando a uma lise osmótica, no caso da perforina, ou fragmentação do DNA induzindo morte celular por apoptose, no caso da granzima B¹⁰⁶.

A granzima B trata-se de uma protease que ao ser internalizada pela célula alvo - processo esse facilitado pela perforina – é capaz de realizar diversos processos enzimáticos indutores da morte celular. Uma vez no citosol da célula alvo, essa molécula é capaz de clivar diretamente a pro-caspase-3 em caspase-3 ativa; ou clivar Bid em gtBid, que ao ser translocado para mitocôndria induz a liberação de citocromo *c* o qual em conjunto com a pro-caspase 9 e APAF-

1 (do inglês *apoptotic protease-activating factor*) formam o apoptossomo capaz de clivar a procaspase 3. A caspase-3 ativa retira a porção inibidora da desoxiribonuclease ativada por caspase (ICAD) que, assim, é translocada para o núcleo onde desencadeia a fragmentação do DNA e consequente morte da célula alvo^{106,107}.

A contribuição de populações imunes GzB+ infiltradas nos tecidos inflamados, em decorrência do bloqueio de *ckeckpoints* imunes, tem sido um dos fatores mais bem estudados e estabelecidos até o momento.

Um dos possíveis eventos adversos imunomediados é o desenvolvimento de miocardite, principalmente em planos terapêuticos com imunoterapia combinada associando anti-PD-1 e anti-CTLA-4. Estudo desenvolvido por Jonhson e colaboradores⁷⁴ e publicado em 2016 pelo *The New England Journal of Medicine* demonstrou em dois estudos de casos de pacientes diagnosticados com melanoma metastático e tratados com terapia combinada a presença de linfócitos T CD8 (CD3+CD8+) infiltrados no miocárdio e músculo esquelético de pacientes que sofreram de miocardite fulminante imunomediada.

Somado ao estudo anterior, mais recentemente, Sobol *et al*⁷⁶ caracterizou, histopatologicamente, o infiltrado imune presente na biópsia cardíaca de 6 pacientes com mesmo desfecho clínico – miocardite – e com diferentes tipos tumorais e esquemas terapêuticos envolvendo os *checkpoints* imunológicos. Nesse estudo destacou-se a presença de linfócitos T CD8+ GzB+ no infiltrado imune do evento adverso, população semelhante a apresentada em nossos resultados. No entanto, em nosso estudo, a identificação dessa população citotóxica foi identificada anterior ao tratamento, além do material biológico utilizado ter sido obtido de maneira menos invasiva, uma vez que para determinação foi necessária apenas coleta de sangue periférico.

Ainda que em uma população diferente e não caracterizada em nosso estudo, Johnson e colaboradores⁷⁸ identificaram também a presença da população T CD4 de memória produtora de GzB e em processo de proliferação (CD4+ CD45RO+GZMB+Ki67+) no tecido inflamado de paciente acometido com encefalomielite imunomediada. Nesse estudo de caso, o paciente diagnosticado com melanoma metastático desenvolveu toxicidade fatal após terapia com pembrolizumabe em 3ª linha - subsequente ao ipilimumabe interrompido por quadro de colite e terapia alvo suspensa por progressão da doença.

Em síntese, os resultados de estudos envolvendo a caracterização de eventos adversos imunomediados vêm demonstrando, no tecido inflamado, por meio de imuno-histoquímica e sequenciamento de RNA, a presença de populações imunes produtoras de granzima B,

indicando o envolvimento dessa principalmente no processo de destruição tecidual decorrente do processo inflamatório.

Atrelado a uma menor dosagem de IL-10 solúvel e aumento na produção de granzima B principalmente por linfócitos T CD8 efetores, identificamos que aqueles pacientes com CPNPC que desenvolvem toxicidade grave têm, também, aumento da frequência de monócitos intermediários (CD11b+ CD14+ CD16+), com maior produção de TNF- α mediante estímulo policlonal, quando comparado aos pacientes *No/Mild*.

O aumento na frequência de monócitos intermediários já foi descrito em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica com doença grave, sendo um importante componente no processo patológico já que esse subtipo expressa grandes quantidades da molécula de histocompatibilidade MHC de classe II, além de diversas citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Esse perfil pró-inflamatório mantido pelos monócitos intermediários fica evidente no estudo de Gómez-Olarte *et al*¹⁰⁸, ao observar a redução na frequência de monócitos intermediários naqueles pacientes que realizaram transplante cardíaco e que, assim, recuperaram uma resposta imune protetora.

Frente a esses resultados, ressaltamos na coorte de CPNPC a presença de uma importante balança imunológica entre mecanismos imunossupressores e igualmente protetores caracterizados, sobretudo, pelo aumento de linfócitos T CD4 totais, de populações de linfócitos Th2 e presença de IL-10 solúvel, mesmo anteriormente ao tratamento, enquanto a presença de CD8 efetores produtores de granzima B, monócitos intermediários e monócitos intermediários produtores de TNF- α foram considerados importantes fatores de risco.

Essa balança torna-se ainda mais evidente pelas regressões multivariadas realizadas, onde a presença de linfócitos T CD4+ total em conjunto com T CD8eff GzB+ ou monócitos intermediários TNF- α + configura bons parâmetros para predição de toxicidades imunomediadas graves em nossa coorte, demonstrando a proteção por linfócitos T CD4 e o risco por populações GzB+ e TNF- α + ao observamos as razões de chance e o poder de predição negativa (90,48%) e positiva (75,00%) do modelo utilizado.

Mesmo cientes das diferenças entre os tipos tumorais no que diz respeito à geração de uma resposta imune direcionada ao tumor, buscamos compreender uma via imunológica e/ou possíveis candidatos a biomarcador que fossem comuns ao desenvolvimento de eventos adversos imunomediados graves independentemente do tumor e para isso agrupamos os tumores para uma análise conjunta (Melanoma e CPNPC).

Inicialmente identificamos por meio de análises não direcionadas, utilizando UMAP como ferramenta de redução dimensional e o FlowSOM como ferramenta para identificação de subpopulações, a presença de uma população de linfócitos TCR $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$ ⁺ TCF-1⁺ PD1^{low} IFN- γ ^{low} TNF- α ⁺ GzB⁺) caracteristicamente pró-inflamatório que se encontra aumentada em pacientes com toxicidades graves, sendo, no entanto, direcionado pela coorte de CPNPC.

Linfócitos TCR $\gamma\delta$, em estudo avaliando seu envolvimento tanto na resposta antiparasitária quanto sua resistência à infecção ao *Trypanosoma cruzi*, demonstrou que mediante sinalização desencadeada pelo receptor de IL-18 (IL-18R) tem sua resposta ativada e apresentou expressão de IFN- γ e granzima B que são importantes para o controle da doença infecciosa e resistência do hospedeiro¹⁰⁹. Esse achado corrobora a população ativada, pró-inflamatória e citotóxica identificada em nosso UMAP e confirmada por nossas análises direcionadas (expressão de IFN- γ , CD161 e GzB).

Conjuntamente à população de linfócitos TCR $\gamma\delta$ expressando diversos marcadores de ativação, identificamos, após estímulo, maior expressão de IFN- γ intracelularmente em pacientes *Severe* nas populações de linfócitos TCR $\alpha\beta$ e, mais especificamente, nas populações de linfócitos T CD4 e T CD8 tanto totais quanto efetores, sendo nesses últimos identificada apenas tendência. O fato de encontrarmos maior expressão de IFN- γ tanto em TCR $\gamma\delta$ quanto em TCR $\alpha\beta$ indica que a produção intracelular aumentada dessa citocina, nesse cenário, é independente do tipo de TCR.

O IFN- γ tem como receptor o IFN γ R e, mediante ligação, desencadeiam vias intracelulares de sinalização baseadas, principalmente, na fosforilação de tiroquisas-quinases. Sua produção se dá em cenários favoravelmente inflamatórios, haja visto que IL-12 e IL-18 atuam estimulando a produção dessa citocina em células NK e linfócitos Th1, sendo esses e linfócitos T CD8 citotóxicos também induzidos a produzir IFN- γ mediante estimulação por antígeno¹¹⁰. A produção dessa citocina, além de estar fortemente envolvida na ativação de macrófagos e polarização desses em perfil M1 – pró-inflamatório - atua de modo especial, parácrina e autócrinamente, no aumento da capacidade de reconhecimento de antígenos apresentados pelas apresentadoras de antígenos¹¹¹.

Uma vez que IFN- γ se liga ao receptor, é possível que ocorram duas vias, uma canônica voltada para fosforilação de STAT1, e outra não canônica que ocorre pela fosforilação de STAT3, podendo, inclusive, ocorrerem simultaneamente. Seguindo a via canônica, após ligação das moléculas *Janus kinase* (JAK1 e JAK2), que estão em contato com o receptor, essas desempenham seu papel quinase e fosforilam a STAT1 em pSTAT1 que se dimeriza e é translocada para o núcleo, onde se ligam na região GAS (do inglês, γ -interferon-activated site)

e induz a transcrição dos genes estimulados/induzidos por IFN, que medeiam processos inflamatórios e favorecem o reconhecimento de antígenos entre outras funções^{110,111}. Exemplos de genes estimulados por IFN são CXCR3, CXCL9, CXCL10, CXCL11.

De maneira contexto-dependente, a via não canônica, pode envolver a fosforilação de STAT3 pelas JAK1 e JAK2 e direcionar para transcrição de genes induzidos por IFN ou, então, ao invés de ativar a via JAK/STAT, induzir a ativação de vias como a da MAPK que diferencialmente levam a transcrição de outros fatores de transcrição, já que se ligam em sítio diferente do DNA¹¹¹.

Estudo clássico publicado por Shankaran e colaboradores¹⁸ demonstrou, em modelo animal com sarcoma induzido quimicamente, a importância de IFN- γ na resposta imune antitumoral como importante fator de proteção, sendo, também, importante no processo de imunogenicidade tumoral, uma vez que a resposta por ele gerada leva à eliminação de clones tumorais susceptíveis, porém seleciona aqueles resistentes.

No âmbito de doenças inflamatórias e autoimunes, a contribuição de IFN- γ no desenvolvimento e manutenção dessas tem se tornado cada vez mais claro. Em estudo voltado para o potencial de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (do inglês, *fibroblast-like synoviocytes* - FLS) envolvidos no processo de degradação tecidual, remodelamento e invasão presentes na artrite reumatoide, demonstraram *in vitro* que a presença de IFN- γ e as vias de sinalizações por ele desencadeadas são cruciais para migração celular e invasão celular, processos que podem ser suprimidos ao inibir JAK1 e JAK2 por meio do fármaco baricitinibe aprovado para o tratamento dessa doença¹¹².

Além da produção de IFN- γ aumentada em pacientes com toxicidade grave, identificamos em nossa coorte também um aumento na produção de TNF- α pelas populações de linfócitos TCR $\alpha\beta$ e linfócitos T CD4 e CD8 totais e efetores. Esse aumento em ambas citocinas é observada apenas intracelularmente, não tendo sido identificada na dosagem realizada no plasma dos pacientes, indicando que esses pacientes G3-G4, mediante estímulo, têm maior produção dessas moléculas.

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) alfa trata-se de uma citocina produzida principalmente pelo compartimento mieloide e tem sua participação descrita em processos autoimunes, doenças inflamatórias e câncer¹¹³. TNF- α se liga aos receptores TNFR1 – envolvido principalmente em processos inflamatórios e de dano tecidual – e TNFR2 – sinais de homeostase, sobrevivência e regeneração tecidual, além de sua expressão em linfócitos T reguladores – e aqui enfocaremos na cascata de sinalização envolvendo o complexo I¹¹⁴.

Mediante a ligação do TNF com seu receptor é deflagrada uma sequência de eventos intracelulares de ubiquitinação – degradação proteica – até a transcrição dos genes envolvidos. O receptor TNFR1 em especial é associado a um complexo de moléculas que se ubiquitinam e garantem a amplificação de sinais que culminam na ativação de duas vias, uma envolvendo MAPK e outra envolvendo a via canônica de NFκB, de modo que quando seus respectivos fatores de transcrição – AP1 e NFκB – se ligam ao DNA, induzem a transcrição de genes associados principalmente à inflamação, proliferação celular, dano tecidual entre outros¹¹⁴.

O papel de TNF-α aparenta grande divergência no que diz respeito ao seu caráter patológico. No contexto de artrite reumatoide – doença autoimune – sinoviócitos semelhantes a fibroblastos quando estimulados com TNF-α aumentam a produção de mediadores inflamatórios (CXCL8, RANTES e preteases) responsáveis tanto pela migração de células imunes quanto pela degradação da cartilagem. Em se tratando de um processo inflamatório crônico, o estudo demonstrou, ainda, que o TNF-α residual (após sinalização inicial) é capaz de sustentar a resposta inflamatória via sinalização prolongada de NFκB¹¹⁵.

Em contrapartida, além de um papel pró-inflamatório que no contexto tumoral se espera a montagem de uma resposta anti-tumoral, estudos apontam essa citocina, principalmente atrelada ao receptor TNFRS2, como pró-tumoral. Nesse contexto, a presença de TNF-α transmembrana, ao se ligar ao receptor presente em células supressoras de linhagem mieloide (MDSCs) leva a sinalização via NFκB que induz sua ativação e acumulação no microambiente tumoral e dada sua capacidade supressora, favorece a progressão tumoral¹¹⁶.

Em estudo utilizando scRNA-seq de pacientes diagnosticados com melanoma e que desenvolveram colite imunomediada, os autores apresentam uma maior expressão de genes de resposta a IFN-γ (CXCL9 e CXCL10, por exemplo) e TNF-α nas populações mieloides, indicando que essas duas vias estariam ativamente presentes no sítio de desenvolvimento de eventos adversos. Ainda que não tenha demonstrado no estudo um aumento significativo dessa assinatura gênica em outras populações celulares, quando avaliados os genes diferencialmente expressos nos compartimentos celulares de linfócitos T é possível identificar, dentre os TOP10, genes associados às vias dessas citocinas (linfócitos T CD8: GZMB, HLA-DR; linfócitos T CD4: GZMA, HLA-DRB1, STAT1, entre outros)⁷⁷.

Nosso estudo, pela primeira vez, demonstrou a presença desse eixo em IFN-γ e TNF-α, por meio de populações imunes produtoras dessas citocinas no sangue *baseline* de pacientes com eventos adversos imunomediados graves decorrentes da imunoterapia com inibidores de *checkpoints* imunológicos.

Ainda que essas citocinas intracelulares, quando dosadas no plasma dos pacientes não tenha evidenciado diferenças significativas entre nossos grupos de estudo, quando analisadas todas as citocinas conjuntamente (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-18, IL-17A, IL-12p70, IL-6 e IL-10) bem como as razões inflamatórias dessas citocinas com IL-10, cabe destaque à razão IL-18/IL-10, que demonstrou estar significativamente aumentada em pacientes com toxicidade grave e a IL-10 que isolada demonstrou tendência ao aumento direcionado em *No/Mild*. Atrelado a esse resultado, ainda que não significativamente, quando avaliamos o perfil desses pacientes pelo *radar chart* (Figura 25A), pudemos observar um direcionamento para o perfil inflamatório focado nas citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-18.

IL-18 e IL-1 β são citocinas pró-inflamatórias produzidas, principalmente, por células imunes como macrófagos e células dendríticas. Uma vez produzidas, essas são armazenadas na sua forma inativa, pró-IL18 e pró-IL1 β , que são ativadas mediante clivagem pela caspase 1, que para exercer sua função requer clivagem pelo inflamassoma NLRP3, que é ativado por meio de sinais extracelulares indutores da via de NF κ B (PAMPs e citocinas como a própria IL-18 e TNF- α)¹¹⁷.

Uma vez clivada e biologicamente ativa, a IL-18 se liga ao seu receptor IL-18R presente em células imunes como por exemplo células NK, macrófagos e DCs, e recruta diversas proteínas que mediante fosforilações sequenciais culminam na degradação de I κ B e consequente liberação de NF κ B, que migra para o núcleo onde induz a transcrição de diversos genes, incluindo o gene referente ao IFN- γ ¹¹⁸.

Sendo a IL-18 dependente, ainda que indiretamente, da ação de NLRP3, é possível traçarmos um paralelo entre nosso achado e o de Luoma e colaboradores⁷⁷ que identificaram um aumento na expressão de genes de regulação de NLRP3 e IL1B (gene referente à IL-1 β) em células mieloides teciduais de pacientes que desenvolveram colite imunomediada em decorrência dos bloqueadores de *checkpoints* imunológicos. Estando essa assinatura mais acentuada em pacientes com toxicidade, é factível que a IL-18 represente esse aumento na expressão de NLRP3.

Percebe-se, portanto, que ao avaliarmos a nossa coorte numa perspectiva conjunta (Melanoma e CPNPC) obtemos populações imunes produtoras de IFN- γ e TNF- α bem como a razão IL-18:IL-10 com alto potencial de biomarcadores, uma vez que nas análises univariadas e multivariadas (TCR $\alpha\beta$ e IL-18:IL-10) retornaram bons resultados referentes à sua capacidade de prever o desenvolvimento de toxicidade imunomediada mensurado pelas razões de chance.

Muito além da identificação de candidatos a biomarcadores, essa avaliação global permitiu também a identificação de um possível mecanismo imunológico central para o

desenvolvimento de eventos adversos de uma forma independente do tumor. Sabemos, no entanto, que para determinar essa via TNF- α /IFN- γ , enquanto uma via imunológica comum, é necessário não só o aumento do tamanho amostral, mas também agregar ao estudo maior variabilidade tumoral, dentre aqueles tumores que já têm a imunoterapia com inibidores de checkpoints imunológicos aprovada.

A sinergia entre TNF- α e IFN- γ já foi descrita na literatura em outras doenças¹¹⁹⁻¹²¹, mas até o presente momento não havia indicadores experimentais que demonstrassem essa sinergia em eventos adversos imunomediados numa coorte heterogênea e em populações celulares avaliadas num momento anterior ao início do tratamento.

Em estudo clássico publicado ainda em 1997, Ohmori et. al¹¹⁹ demonstraram a existência da sinergia presente entre essas duas citocinas, de modo que cada uma com sua particularidade, isto é, IFN- γ por meio de STAT1 e TNF- α por meio de NF κ B, eram capazes de melhorar e aumentar a expressão de mediadores inflamatórios.

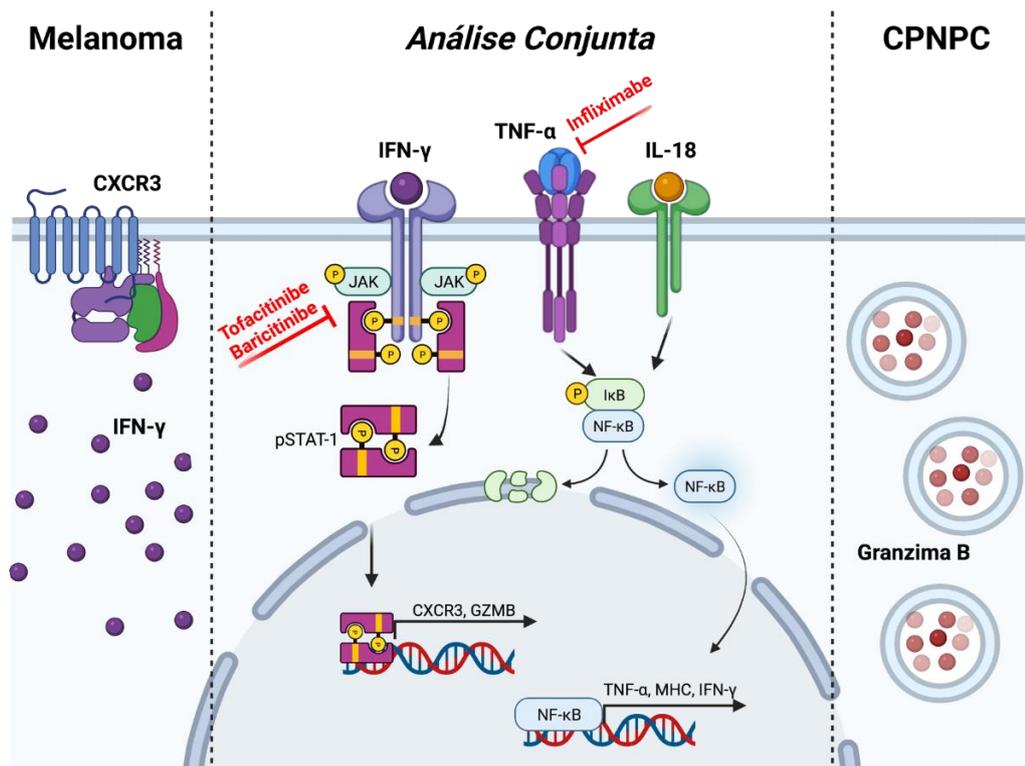
Atualmente, estudo publicado por Karki e colaboradores em 2021 demonstrou sinergia semelhante entre as citocinas até aqui discutidas. Nesse trabalho, tendo em vista que a infecção por SARS-CoV-2 leva à uma “tempestade de citocinas” e, conseqüentemente, a um quadro inflamatório exacerbado com danos pulmonares e falhas de órgãos, os autores demonstraram em modelo animal que ao tratar macrófagos derivados da medula óssea e PBMCs com as principais citocinas inflamatórias aumentadas em pacientes infectados pelo vírus, a combinação de TNF- α e IFN- γ era decisiva para que se desencadeasse a morte celular - piroptose, apoptose ou necroptose- regulada pelo eixo JAK/STAT1/IRF1/Caspase8¹²⁰.

Ainda que precocemente, dada a necessidade de validação em larga escala de nossos achados, é importante se discutir a aplicabilidade clínica dos resultados aqui obtidos. Uma vez que identificamos as populações celulares e citocinas num momento anterior ao desenvolvimento de irAEs, uma alternativa viável é, num primeiro momento, identificar por exames laboratoriais aqueles pacientes com maior predisposição a toxicidades graves conforme nossos candidatos a biomarcadores e, em seguida, propor um plano de tratamento adequado às condições do indivíduo.

Uma vez identificados os pacientes, é possível, com a evolução de nossa pesquisa e desenvolvimento de estudos clínicos, propor medidas terapêuticas logo no início do tratamento em conjunto com a imunoterapia que ajam nas vias indutoras de toxicidade e garantam proteção aos quadros imunomediados graves, mas que, de forma específica e com ajuste de dosagem, mantenham a resposta anti-tumoral.

De modo geral, podemos inferir que nossos resultados tumor-específicos convergem em certo ponto para o eixo identificado na avaliação combinada (IFN- γ /TNF- α) como demonstrado no modelo da Figura 29. Salientamos que atualmente já existem fármacos disponíveis para o tratamento de doenças inflamatórias, autoimunes e/ou infecciosas que atuam em pontos dessa sinergia^{122,123}. Dentre eles, destacamos o Tofacitinibe¹²⁴ – inibidor de JAK-STAT – e o Infliximabe¹²⁵ – inibidor de TNF- α –, cujas publicações já apontam para utilização desses no tratamento de toxicidades imunomediadas, principalmente quando corticorefratárias.

No entanto, até o momento, carecem de estudos que visem empregá-los de maneira preventiva e/ou comprovar a ação direta desses fármacos em mecanismos específicos do desenvolvimento de eventos adversos imunomediados decorrentes da imunoterapia com inibidores de *checkpoints* imunológicos.



Fonte: Criado em Biorender (<https://biorender.com/>)

Figura 29 – Modelo sugerido da sinergia IFN- γ /TNF- α no contexto do desenvolvimento de irAEs e possíveis alvos terapêuticos. IFN- γ , uma vez em contato com seu receptor, é capaz de ativar a via JAK/STAT1, que por meio de processos de fosforilação ativa a STAT que se dimeriza e transloca para o núcleo, onde se liga na região GAS (*gamma-interferon-activated site*) e induz a transcrição de genes como CXCR3 e GZMB. Esses genes levam à tradução de CXCR3 e granzima B que, como identificamos, estão associadas ao desenvolvimento de toxicidade grave em pacientes com melanoma e CPNPC, respectivamente. TNF- α e IL-18, por sua vez, ativam a via de NF- κ B, que do ponto de vista pró-inflamatório, auxilia na produção e perpetuação das citocinas aqui descritas e aumenta expressão de MHC, além de regular genes do inflamassoma NLRP3. Do ponto de vista clínico, já estão disponíveis fármacos capazes de bloquear JAK/STAT (Tofacitinibe e Baricitinibe), inibindo sinalização causada por IFN- γ , e capturar e reduzir a disponibilidade de TNF- α solúvel (Infliximabe). Esses fármacos e outros capazes de atuar em demais pontos da via aqui sugerida seriam interessantes ferramentas no manejo precoce ou até mesmo prevenção de eventos adversos imunomediado graves.

7. CONCLUSÃO

Ao avaliarmos parâmetros imunes, antes do início de tratamento, em pacientes com melanoma e CPNPC tratados com imunoterapia com inibidores de checkpoints imunológicos, observamos que a sinergia entre IFN- γ e TNF- α é uma possível via imunológica responsável pelo estabelecimento de eventos adversos imunomediados e que parâmetros imunes associados a essa via (CXCR3, granzima B e IL-18) podem ser úteis como biomarcadores capazes de prever esse desfecho, mesmo antes do início da imunoterapia. Assim, nossos resultados têm alto potencial clínico tanto na triagem de candidatos à imunoterapia com ICI, quanto como mecanismos alvos para abordagens terapêuticas e manejo clínico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Feitelson MA, Arzumanyan A, Kulathinal RJ, Blain SW, Holcombe RF, Mahajna J, et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2015;35:S25–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.006>
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49.
3. Global Cancer Observatory, IARC. Global Cancer Burden in 2022 [Internet]. 2020. Available from: <https://infogram.com/globocan-2020-1h9j6qg7xdp8v4g?live>
4. INCA. Estimativa 2020|Incidência do Câncer no Brasil. 2019.
5. Bishop JM, Weinberg RA (Robert A, Scientific American I. How Cancer Arises. 1996. p. 255.
6. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004;10(8):789–99.
7. Shen L, Shi Q, Wang W. Double agents: genes with both oncogenic and tumor-suppressor functions. *Oncogenesis* [Internet]. 2018;7(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41389-018-0034-x>
8. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* [Internet]. 2000 Jan;100(1):57–70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400816839>
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
10. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* [Internet]. 2022;12(1):31–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35022204>
11. Burnet M. A. Cancer - a biological approach, I-II. *Br Med J*. 1957;(5022):779–86.
12. Finn OJ. A Believer's Overview of Cancer Immunosurveillance and Immunotherapy. *J Immunol*. 2018;200(2):385–91.
13. Burnet F. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*. 1969;13:1–27.
14. Herberman RB, Holden HT. Natural cell-mediated immunity. *Adv Cancer Res*. 1978 Jan 1;27(C):305–77.

15. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD, Bruce AT, Ikeda H. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* [Internet]. 2002;3(11):991–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/ni1102-991%0Ahttp://proxy.library.vcu.edu/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,cookie,uid&db=ccm&AN=106445260&site=ehost-live&scope=site>
16. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* [Internet]. 2004;21:137–48. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2887496&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
17. O’Donnell JS, Teng MWL, Smyth MJ. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2019;16(3):151–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-018-0142-8>
18. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* [Internet]. 2001 Apr 26;410(6832):1107–11. Available from: <http://www.nature.com/articles/35074122>
19. Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* [Internet]. 2001 Jan 1;97(1):192–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11133760>
20. Ni L, Lu J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Med*. 2018;7(9):4509–16.
21. Teng MWL, Kershaw MH, Smyth MJ. Cancer Immunoediting. In: *Cancer Immunotherapy* [Internet]. Elsevier; 2013. p. 85–99. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123942968000075>
22. Beatty GL, Gladney WL. Immune Escape Mechanisms as a Guide for Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2015 Feb 15;21(4):687–92. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-14-1860>
23. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2014;27(1):16–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>
24. Patel SA, Minn AJ. Combination Cancer Therapy with Immune Checkpoint Blockade: Mechanisms and Strategies. *Immunity* [Internet]. 2018;48(3):417–33. Available from:

- <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.007>
25. Dobosz P, Dzieciatkowski T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2019;10(December).
 26. Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2020;17(8):807–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-020-0488-6>
 27. Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015;15(7):405–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3845>
 28. Domingues B, Lopes J, Soares P, Populo H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther*. 2018;Volume 7:35–49.
 29. Burstein H, Dizon DS, Gabriela Chiorean E, Allen Chow W, Frederick De Groot J, Michael Devine S, et al. Clinical cancer advances: ASCO’s 12th Annual Report on Progress Against Cancer. ASCO [Internet]. 2017; Available from: <https://www.asco.org/sites/new-www.asco.org/files/content-files/research-and-progress/documents/2017-cca-report.pdf>
 30. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol*. 2018;8(March):1–14.
 31. Jaiswal. Inflammatory Cytokines as a Third Signal for T Cell Activation Julie. *Bone* [Internet]. 2014;23(1):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 32. Hwang JR, Byeon Y, Kim D, Park SG. Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Exp Mol Med* [Internet]. 2020;52(5):750–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-020-0435-8>
 33. Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell*. 1992;71(7):1065–8.
 34. M.L. A, K.A. F, C.B. T. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2001;1(3):220–8. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L35640872>
 35. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2012;12(4):252–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3239>

36. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of Antitumor Immunity by. *Science* (80-). 1988;7(23):1734–6.
37. Hodi F, O'Day S, McDermott D, Weber R, Urba W. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *new Engl Med*. 2010;363(8):1597–607.
38. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2018;378(14):1277–90.
39. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz HJ, Gelsomino F, Aglietta M, et al. Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(8):773–9.
40. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* [Internet]. 1992 Nov;11(11):3887–95. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x>
41. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. 1996;8(5):765–72.
42. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. *Immunity* [Internet]. 1999 Aug;11(2):141–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10485649>
43. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: From discovery to clinical application. *Int Immunol*. 2007;19(7):813–24.
44. Fife BT, Pauken KE, Eagar TN, Obu T, Wu J, Tang Q, et al. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR – induced stop signal. *Nat Immunol*. 2009;10(11):1185–93.
45. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(3):153–67.
46. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development , maintenance , and function of induced regulatory T cells. 2009;206(13):3015–29.
47. Liu X, Hogg GD, Denardo DG. Rethinking immune checkpoint blockade: Beyond the T cell. Vol. 9, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. BMJ Publishing Group; 2021.

48. 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.
49. Raedler BLA, Writer M. Opdivo (Nivolumab): Second PD-1 Inhibitor Receives FDA Approval for Unresectable or Metastatic Melanoma. 2015;8(March):1–4.
50. 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.
51. 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.
52. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob JJ, Halpern A, et al. Melanoma. *Nat Rev Dis Prim*. 2015;1(April):1–20.
53. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob J-J, Cowey CL, et al. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2017;377(14):1345–56.
54. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob J-J, Rutkowski P, Lao CD, et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2019;381(16):1535–46.
55. Lebbé C, Meyer N, Mortier L, Marquez-Rodas I, Robert C, Rutkowski P, et al. Evaluation of two dosing regimens for nivolumab in combination with ipilimumab in patients with advanced melanoma: Results from the phase IIIb/IV CheckMate 511 trial. *J Clin Oncol*. 2019;37(11):867–75.
56. Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, Guarize J, Karachaliou N, Mok T, et al. Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Prim*. 2015;1:1–16.
57. Paz-Ares LG, Ramalingam SS, Ciuleanu TE, Lee JS, Urban L, Caro RB, et al. First-Line Nivolumab Plus Ipilimumab in Advanced NSCLC: 4-Year Outcomes From the Randomized, Open-Label, Phase 3 CheckMate 227 Part 1 Trial. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2021;1–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.09.010>
58. Gadgeel S, Rodríguez-Abreu D, Speranza G, Esteban E, Felip E, Dómine M, et al. Updated analysis from KEYNOTE-189: Pembrolizumab or placebo plus pemetrexed and platinum for previously untreated metastatic nonsquamous non–small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2020;38(14):1505–17.
59. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in Ctlα-4. *Science*

- (80-) [Internet]. 1995 Nov 10;270(5238):985–8. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/332/6029/600>
60. Samaan MA, Pavlidis P, Papa S, Powell N, Irving PM. Gastrointestinal toxicity of immune checkpoint inhibitors: From mechanisms to management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2018;15(4):222–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2018.14>
 61. NIH. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). 2017;5:1–147.
 62. Ramos-Casals M, Lambotte O, Kostine M, Calabrese L, Suarez-Almazor M, Bingham C, et al. Immune-related adverse events induced by cancer immunotherapies. Big Data analysis of 13051 cases (ImmunoCancer International Registry). In: Poster Presentations [Internet]. BMJ Publishing Group Ltd and European League Against Rheumatism; 2019. p. 607–8. Available from: <https://ard.bmj.com/lookup/doi/10.1136/annrheumdis-2019-eular.2707>
 63. Xu C, Chen Y-P, Du X-J, Liu J-Q, Huang C-L, Chen L, et al. Comparative safety of immune checkpoint inhibitors in cancer: systematic review and network meta-analysis. *BMJ* [Internet]. 2018 Nov 8;k4226. Available from: <https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.k4226>
 64. Ramos-Casals M, Brahmer JR, Callahan MK, Flores-Chávez A, Keegan N, Khamashta MA, et al. Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors. *Nat Rev Dis Prim*. 2020;6(1).
 65. Pauken KE, Dougan M, Rose NR, Lichtman AH, Sharpe AH. Adverse Events Following Cancer Immunotherapy: Obstacles and Opportunities. *Trends Immunol* [Internet]. 2019;40(6):511–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.002>
 66. Dougan M, Luoma AM, Dougan SK, Wucherpfennig KW. Understanding and treating the inflammatory adverse events of cancer immunotherapy. *Cell* [Internet]. 2021;184(6):1575–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.011>
 67. Champiat S, Lambotte O, Barreau E, Belkhir R, Berdelou A, Carbonnel F, et al. Management of immune checkpoint blockade dysimmune toxicities: a collaborative position paper. *Ann Oncol* [Internet]. 2016 Apr;27(4):559–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419357503>
 68. Remon J, Mezquita L, Corral J, Vilariño N, Reguart N. Immune-related adverse events with immune checkpoint inhibitors in thoracic malignancies : focusing on non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Dis*. 2018;10(5):1516–33.
 69. Weber JS, Hodi FS, Wolchok JD, Topalian SL, Schadendorf D, Larkin J, et al. Safety

- profile of nivolumab monotherapy: A pooled analysis of patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol*. 2017;35(7):785–92.
70. Wainstein, Alberto Julius; Calabrich, Aknar ; Melo, Andréia Cristina de; Buzaid, Antonio Carlos; Katz, Artur; Anjos, Carlos Augusto dos; Ferreira, Carlos Gil; Baldotto, Clarissa et al. “Diretrizes brasileiras de manejo de toxicidades imunomediadas associadas ao uso de bloqueadores de correceptores imunes.” *Braz J Oncol*. 2017;13(43):1–15.
 71. Haanen J, Ernstoff M, Wang Y, Menzies A, Puzanov I, Grivas P, et al. Rechallenge patients with immune checkpoint inhibitors following severe immune-related adverse events: review of the literature and suggested prophylactic strategy. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2020 Jun;8(1):e000604. Available from: <https://jitc.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jitc-2020-000604>
 72. Allison A. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus* [Internet]. 2005 Mar 4;14(3_suppl):2–8. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1191/0961203305LU2109OA>
 73. Esfahani K, Elkrief A, Calabrese C, Hudson M, Routy B, Jr WHM, et al. Moving towards personalized treatments of immune-related adverse events. *Nat Rev Dis Prim*. 2020;
 74. Douglas B. Johnson, M.D., Justin M. Balko, PharmD, Ph.D., [...], and Javid J. Moslehi MD. Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med*. 2016;1749–55.
 75. Iwama S, De Remigis A, Callahan MK, Slovin SF, Wolchok JD, Caturegli P. Pituitary Expression of CTLA-4 Mediates Hypophysitis Secondary to Administration of CTLA-4 Blocking Antibody. *Sci Transl Med* [Internet]. 2014 Apr 2;6(230). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3008002>
 76. Sobol I, Chen CL, Mahmood SS, Borczuk AC. Histopathologic Characterization of Myocarditis Associated With Immune Checkpoint Inhibitor Therapy. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2020;144(11):1392–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32150459>
 77. Luoma AM, Suo S, Williams HL, Sharova T, Sullivan K, Manos M, et al. Molecular Pathways of Colon Inflammation Induced by Cancer Immunotherapy. *Cell* [Internet]. 2020;182(3):655–671.e22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.001>
 78. Johnson DB, McDonnell WJ, Gonzalez-ericsson PI, Al-rohil RN, Mobley BC, Salem J, et al. A case report of clonal EBV-like memory CD4 + T cell activation in fatal checkpoint inhibitor- induced encephalitis. *Nat Med*. 2019;

79. Hwan K, Young J, Cho J, Mi B, Koh J, Young J, et al. Immune-related adverse events are clustered into distinct subtypes by T-cell profiling before and early after anti-PD-1 treatment. *Oncoimmunology*. 2020;9(01):1–12.
80. Das R, Bar N, Ferreira M, Newman AM, Zhang L, Bailur JK, et al. Early B cell changes predict autoimmunity following combination immune checkpoint blockade. *J Clin Invest* [Internet]. 2018 Jan 8;128(2):715–20. Available from: <https://www.jci.org/articles/view/96798>
81. Lim SY, Lee JH, Gide TN, Menzies AM, Guminski A, Carlino MS, et al. Circulating cytokines predict immune-related toxicity in melanoma patients receiving anti-PD-1–based immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2019;25(5):1557–63.
82. Tyan K, Baginska J, Brainard M, Giobbie-Hurder A, Severgnini M, Manos M, et al. Cytokine changes during immune-related adverse events and corticosteroid treatment in melanoma patients receiving immune checkpoint inhibitors. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2021;70(8):2209–21. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00262-021-02855-1>
83. Subudhi SK, Aparicio A, Gao J, Zurita AJ, Araujo JC, Logothetis CJ, et al. Clonal expansion of CD8 T cells in the systemic circulation precedes development of ipilimumab-induced toxicities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(42):11919–24.
84. Khoja L, Day D, Wei-Wu Chen T, Siu LL, Hansen AR. Tumour- and class-specific patterns of immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors: a systematic review. *Ann Oncol* [Internet]. 2017 Oct;28(10):2377–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419349269>
85. Lozano AX, Chaudhuri AA, Nene A, Bacchiocchi A, Earland N, Vesely MD, et al. T cell characteristics associated with toxicity to immune checkpoint blockade in patients with melanoma. *Nat Med*. 2022;
86. Ghisoni E, Wicky A, Bouchaab H, Imbimbo M, Delyon J, Gautron Moura B, et al. Late-onset and long-lasting immune-related adverse events from immune checkpoint-inhibitors: An overlooked aspect in immunotherapy. *Eur J Cancer*. 2021;149:153–64.
87. Brummelman J, Haftmann C, Núñez NG, Alvisi G, Mazza EMC, Becher B, et al. Development , application and computational analysis of high-dimensional fluorescent antibody panels for single-cell flow cytometry. *Nat Protoc* [Internet]. 2019;14(July). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41596-019-0166-2>
88. Houser B. Bio-Rad 's Bio-Plex ® suspension array system , xMAP technology overview. 2012;118(June):192–6.

89. Xia J, Wishart DS. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nat Protoc* [Internet]. 2011;6(6):743–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2011.319>
90. Chong J, Wishart DS, Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinforma*. 2019;68(1):1–128.
91. Pang Z, Chong J, Zhou G, De Lima Morais DA, Chang L, Barrette M, et al. MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(W1):W388–96.
92. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D607–13.
93. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W566–70.
94. Mousset CM, Hobo W, Woestenenk R, Preijers F, Dolstra H, van der Waart AB. Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytom Part A*. 2019;95(6):647–54.
95. Hussaini S, Chehade R, Boldt RG, Raphael J, Blanchette P, Maleki Vareki S, et al. Association between immune-related side effects and efficacy and benefit of immune checkpoint inhibitors – A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2021;92(November 2020):102134. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102134>
96. Billottet C, Quemener C, Bikfalvi A. CXCR3, a double-edged sword in tumor progression and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2013;1836(2):287–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.08.002>
97. Karin N. CXCR3 Ligands in Cancer and Autoimmunity, Chemoattraction of Effector T Cells, and Beyond. *Front Immunol*. 2020;11(May):1–9.
98. Xanthou G, Duchesnes CE, Williams TJ, Pease JE. CCR3 functional responses are regulated by both CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11. *Eur J Immunol*. 2003;33(8):2241–50.
99. Kuo PT, Zeng Z, Salim N, Mattarollo S, Wells JW, Leggatt GR. The role of CXCR3 and its chemokine ligands in skin disease and cancer. *Front Med*. 2018;5(SEP):1–10.
100. Karin N, Wildbaum G, Thelen M. Biased signaling pathways via CXCR3 control the

- development and function of CD4 + T cell subsets . *J Leukoc Biol.* 2016;99(6):857–62.
101. Zohar Y, Wildbaum G, Novak R, Salzman AL, Thelen M, Alon R, et al. CXCL11-dependent induction of FOXP3-negative regulatory T cells suppresses autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 2017;127(10):3913.
 102. Chow MT, Ozga AJ, Servis RL, Frederick DT, Lo JA, Fisher DE, et al. Intratumoral Activity of the CXCR3 Chemokine System Is Required for the Efficacy of Anti-PD-1 Therapy. *Immunity* [Internet]. 2019;50(6):1498-1512.e5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.010>
 103. Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, Puccini A, Berger MD, Soni S, et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation – A target for novel cancer therapy. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2018;63:40–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.007>
 104. Kim HJ, Cantor H. CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(2):91–8.
 105. Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med.* 2007;204(2):239–43.
 106. Lord SJ, Rajotte R V., Korbitt GS, Bleackley RC. Granzyme B: A natural born killer. *Immunol Rev.* 2003;193:31–8.
 107. Boivin WA, Cooper DM, Hiebert PR, Granville DJ. Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: Challenging the dogma. *Lab Investig.* 2009;89(11):1195–220.
 108. Gómez-olarte S, Bolaños NI, Echeverry M, Rodríguez AN. Intermediate Monocytes and Cytokine Production Associated With Severe Forms of Chagas Disease. 2019;10(July):1–10.
 109. da Mota JB, Echevarria-Lima J, Kyle-Cezar F, Melo M, Bellio M, Scharfstein J, et al. IL-18R signaling is required for $\gamma\delta$ T cell response and confers resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Leukoc Biol.* 2020;108(4):1239–51.
 110. Ivashkiv LB. IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2018;18(9):545–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-018-0029-z>
 111. Green DS, Young HA, Valencia JC. Current prospects of type II interferon γ signaling & autoimmunity. *J Biol Chem* [Internet]. 2017;292(34):13925–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R116.774745>
 112. Karonitsch T, Beckmann D, Dalwigk K, Niederreiter B, Studenic P, Byrne RA, et al.

- Targeted inhibition of janus kinases abates interferon gamma-induced invasive behaviour of fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2018;57(3):572–7.
113. S, Gautamethi, Bokyung Sung BBA. TNF: A master switch for inflammation to cancer Gautam Sethi, Bokyung Sung, Bharat B. Aggarwal. *Front Biosci*. 2008;5094–107.
 114. Kallioli GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(1):49–62.
 115. Lee A, Qiao Y, Grigoriev G, Chen J, Park-Min KH, Park SH, et al. Tumor necrosis factor α Induces sustained signaling and a prolonged and unremitting inflammatory response in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2013;65(4):928–38.
 116. Hu X, Li B, Li X, Zhao X, Wan L, Lin G, et al. Transmembrane TNF- α Promotes Suppressive Activities of Myeloid-Derived Suppressor Cells via TNFR2. *J Immunol*. 2014;192(3):1320–31.
 117. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci [Internet]*. 2019 Jul 6;20(13):3328. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/13/3328>
 118. Hirooka Y, Nozaki Y. Interleukin-18 in Inflammatory Kidney Disease. *Front Med*. 2021;8(March):1–10.
 119. Ohmori Y, Schreiber RD, Hamilton TA. Synergy between interferon- γ and tumor necrosis factor- α in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor κ B. *J Biol Chem [Internet]*. 1997;272(23):14899–907. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.23.14899>
 120. Karki R, Sharma BR, Tuladhar S, Williams EP, Zalduondo L, Samir P, et al. Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. *Cell [Internet]*. 2021;184(1):149-168.e17. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.025>
 121. Gordon RA, Grigoriev G, Lee A, Kallioli GD, Ivashkiv LB. The interferon signature and STAT1 expression in rheumatoid arthritis synovial fluid macrophages are induced by tumor necrosis factor α and counter-regulated by the synovial fluid microenvironment. *Arthritis Rheum*. 2012;64(10):3119–28.
 122. Novais FO, Nguyen BT, Scott P. Granzyme B Inhibition by Tofacitinib Blocks the Pathology Induced by CD8 T Cells in Cutaneous Leishmaniasis. *J Invest Dermatol [Internet]*. 2021;141(3):575–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.07.011>
 123. Rosengren S, Corr M, Firestein GS, Boyle DL. The JAK inhibitor CP-690,550

- (tofacitinib) inhibits TNF-induced chemokine expression in fibroblast-like synoviocytes: Autocrine role of type I interferon. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(3):440–7.
124. Esfahani K, Hudson M, Batist G. Tofacitinib for Refractory Immune-Related Colitis from PD-1 Therapy. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Jun 11;382(24):2374–5. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc2002527>
 125. Araujo D V., Muniz TP, Yang A, Keshavarzi S, Sorotsky H, Butler MO, et al. Real world outcomes and hepatotoxicity of infliximab in the treatment of steroid-refractory immune-related adverse events. *Curr Oncol*. 2021;28(3):2173–9.

São Paulo, 05 de fevereiro de 2020.

Ao

Dr. Kenneth John Gollob

Aluno: Guilherme Ferreira de Britto Evangelista (Mestrado)

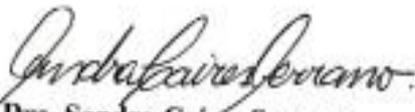
Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2671/19C

“Mecanismos imunes e biomarcadores sistêmicos associados ao desenvolvimento de eventos adversos imunomediados em pacientes com câncer tratados com imunoterapia.”

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **04/02/2020**, **analisaram e aprovaram** o seguinte documento:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático “Determinação de mecanismos imunes e biomarcadores sistêmicos associados à falta de resposta à imunoterapia e desenvolvimento de eventos adversos em pacientes com câncer.”, registrado neste CEP sob nº. 2671/19. O projeto afiliado em referência será Mestrado do aluno Guilherme Ferreira de Britto Evangelista, sob orientação do Dr. Kenneth John Gollob.

Atenciosamente,



Dra. Sandra Caires Serrano
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa