

# **Identificação de Biomarcadores em doentes com Cancro do Pulmão de Não-pequenas Células tratados com Imunoterapia**

**Inês Duarte dos Santos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
(Mestrado Integrado)

Orientadora: Dra. Maria de La Salette Beirão Valente

**maio de 2022**



# **Agradecimentos**

À Dra. Salete pela amabilidade e disponibilidade, pela preocupação e acessibilidade, pelo interesse e sugestões.

Aos meus pais por me ampararem cada queda e me darem a mão em cada conquista. Pelo apoio imenso, pelas palavras certas, pela força que eu precisava, pelo amor mais puro e verdadeiro.

À minha família e aos meus amigos de sempre por me perdoarem cada ausência e me fazerem sentir em casa sempre que regresso.

Aos amigos que conheci na Cidade Neve pelo apoio, pela cumplicidade e carinho, por terem feito destes seis anos os mais incríveis e por me deixarem levá-los comigo para sempre.



# Prefácio

*C'est le temps que tu as perdu pour ta rose qui fait ta rose si importante.*

Antoine de Saint-Exupéry



## **Resumo**

O cancro do pulmão representa 95% dos tumores epiteliais malignos e apresenta uma taxa de incidência em constante crescimento. Nos países ocidentais, é já a principal causa de morte por doença oncológica e estima-se que cerca de 1 milhão de pessoas morra por ano, em todo o mundo.

De acordo com a OMS, o cancro do pulmão pode ser classificado histologicamente em: carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC) e carcinoma pulmonar de não-pequenas células (CPNPC). Os carcinomas pulmonares de não-pequenas células representam cerca de 80% dos casos de carcinoma pulmonar e incluem dois tipos major: não escamoso (que, por sua vez, inclui adenocarcinoma, carcinoma de grandes células e outros subtipos) e escamoso (epidermoide).

O tratamento do carcinoma de não-pequenas células sofreu, nos últimos anos, mudanças significativas resultantes do recurso a terapia dirigida e imunoterapia, o que contribuiu para o aumento da taxa de sobrevivência e da qualidade de vida destes doentes. No entanto, apesar da imunoterapia se ter revelado um dos avanços mais importantes, apenas uma parte da população de doentes com CPNPC beneficia dela.

A identificação e o estudo de potenciais biomarcadores, que são preditores da resposta ao tratamento com imunoterapia, permitem a seleção dos doentes que mais beneficiarão dela. Permitem também monitorizá-los durante o tratamento e inferir sobre o seu prognóstico. São vários os biomarcadores já identificados e estudados, alguns relacionados com o próprio tumor, outros ligados ao seu microambiente e, por fim, alguns derivados do hospedeiro.

Cada biomarcador mencionado na presente monografia revela utilidade e apresenta também limitações, pelo que uma combinação de múltiplos biomarcadores poderá ser a melhor alternativa para prever a eficácia da imunoterapia. Em suma, existe ainda um longo caminho a percorrer e é premente a realização de estudos prospetivos que validem a utilidade destes biomarcadores e contribuam para a uniformização do seu uso na prática clínica.

## **Palavras-chave**

Biomarcadores; Cancro do Pulmão de Não-pequenas Células; Imunoterapia.



# **Abstract**

Lung cancer represents 95% of malignant epithelial tumors and has a constantly growing incidence rate. In western countries, it is already the main cause of death from cancer and it is estimated that about 1 million people die every year, worldwide.

According to the WHO, lung cancer can be classified histologically into: small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC). Non-small cell lung carcinomas account for about 80% of lung carcinoma cases and include two major types: nonsquamous (which includes adenocarcinoma, large cell carcinoma, and other subtypes) and squamous (epidermoid).

The treatment of non-small cell lung carcinoma has undergone, in recent years, significant changes resulting from the use of targeted therapy and immunotherapy, which has contributed to an increase in the survival rate and quality of life of these patients. However, although immunotherapy has proved to be one of the most important advances, only a part of the NSCLC patient population benefits from it.

The identification and study of potential biomarkers, which are predictors of response to immunotherapy treatment, allow the selection of patients who will benefit most from it. They also allow monitoring them during treatment and inferring their prognosis. There are several biomarkers already identified and studied, some related to the tumor itself, others linked to the microenvironment and, finally, some to the host.

Each biomarker mentioned in this monography shows strengths and weaknesses, therefore, a combination of multiple biomarkers may be the best alternative to predict the effectiveness of immunotherapy. In conclusion, there is still a long way to go and it is urgent to carry out prospective studies that validate the usefulness of these biomarkers and contribute to the standardization of their use in clinical practice.

# **Keywords**

Biomarkers; Non-small cell lung cancer; Immunotherapy.



# Índice

Lista de Acrónimos	xiii
1. Metodologia	1
2. Cancro do Pulmão	3
2.1. Definição e Classificação	3
2.2. Epidemiologia	3
2.3. Etiologia e Fisiopatologia	4
2.4. Apresentação Clínica	6
2.5. Cancro do Pulmão de Não-Pequenas Células	7
2.5.1. Adenocarcinoma do Pulmão	7
2.5.2. Carcinoma Pulmonar Escamoso	8
2.5.3. Carcinoma de Grandes Células	9
3. Imunoterapia	11
4. Biomarcadores	13
4.1. Ligante da Proteína 1 da Morte Celular Programada	13
4.2. Carga Mutacional Tumoral	14
4.3. Mutações Genéticas	16
4.4. Microambiente Tumoral e Linfócitos Infiltrantes no Tumor	19
4.5. Células tumorais circulantes, células sanguíneas periféricas e DNA livre de células circulantes	21
4.6. Proteína C reativa	21
4.7. Score Albumina-Bilirrubina (ALBI)	22
4.8. Proteína Amiloide A Sérica	22
4.9. Microbiota Intestinal	23
5. Conclusões Finais e Perspetivas Futuras	27
Referências Bibliográficas	29



## Lista de Acrónimos

OMS	Organização Mundial de Saúde
CPPC	Cancro do Pulmão de Pequenas Células
CPNPC	Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células
UMA	Unidades Maço Ano
PTH	Hormona Paratiroideia
CEA	Antigénio Carcinoembriogénico
TTF-1	Fator de Transcrição da Tiroideia
TC	Tomografia Computadorizada
ICIs	Inibidores dos <i>Checkpoints</i> Imunitários
PD-1	Proteína 1 da Morte Celular Programada
PD-L1	Ligante da Proteína 1 da Morte Celular Programada
CTLA-4	Antigénio 4 do Linfócito T Citotóxico
NK	<i>Natural Killer</i>
TILs	Linfócitos Infiltrantes no Tumor
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
Mb	Megabase
MHC	Complexo Major de Histocompatibilidade
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i>
STK11/LKB1	<i>Serine/Threonine Kinase 11</i>
KEAP1	<i>Kelch-like ECH-associated Protein 1</i>
ARID1A	<i>AT-rich Interactive Domain-containing Protein A</i>
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
KMT2C	<i>Lysine Methyltransferase 2C</i>
EGFR	Recetor do Fator de Crescimento Epidérmico
ALK	<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
BRAF	<i>B-Raf Proto-Oncogene</i>
RTK	<i>Receptor Tyrosine Kinases</i>
LRP1B	<i>LDL Receptor Related Protein 1B</i>
PTPRT	<i>Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type T</i>
IFN- $\gamma$	Interferão $\gamma$
IL-5	Interleucina 5
CAN	Contagem Absoluta de Neutrófilos
RNL	Rácio Neutrófilos-Linfócitos
RPL	Rácio Plaquetas-Linfócitos

ctDNA	DNA Tumoral Livre de Células Circulantes
IL-6	Interleucina 6
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
PCR	Proteína C Reativa
ALBI	Albumina-Bilirrubina
PS	<i>Performance Status</i>
SAA	Amiloide A Sérica
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
IBPs	Inibidores da Bomba de Protões
AGCC	Ácidos Gordos de Cadeia Curta

# **1. Metodologia**

O processo de realização desta monografia teve início numa pesquisa bibliográfica na base de dados PubMed com recurso às palavras-chave: “Biomarcadores”, “Cancro do Pulmão de Não-pequenas Células” e “Imunoterapia”. Esta pesquisa foi restrita a artigos publicados em inglês e português, no último ano e nos meses iniciais do presente ano, com texto completo disponível em regime de livre acesso. Com base na leitura do título e do resumo, foram selecionados os artigos relevantes para o tema escolhido e, posteriormente, procedeu-se à leitura integral dos artigos incluídos. Foi efetuada uma seleção, compilação e síntese da informação contida nos artigos selecionados, que se revelou pertinente para a redação da presente monografia. Foram ainda consultados manuais de Medicina Geral, assim como normas de orientação clínica portuguesas e europeias.



## **2. Cancro do Pulmão**

### **2.1. Definição e Classificação**

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define cancro do pulmão como todas as formações tumorais que têm origem no epitélio respiratório (brônquios, bronquíolos e alvéolos). (1)

O cancro do pulmão pode ser dividido e classificado em dois grandes grupos: carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC) e carcinoma pulmonar de não-pequenas células (CPNPC). Os CPNPC incluem carcinomas escamosos, adenocarcinomas e carcinomas de grandes células. (1,2)

### **2.2. Epidemiologia**

Os CPPC representam 12% a 15% dos cancros do pulmão, enquanto os CPNPC constituem a maioria, representando cerca de 80% a 85%. (3)

Nos últimos anos, ocorreu uma diminuição progressiva da incidência dos CPPC ao mesmo tempo que ocorreu um aumento progressivo dos CPNPC, em especial do tipo adenocarcinoma. (3)

Nos países ocidentais, o cancro do pulmão é a principal causa de morte por doença oncológica, estimando-se que cerca de 1 milhão de pessoas morra por ano, em todo o mundo. (2,3) Na verdade, em 2020, esta estimativa foi largamente ultrapassada, tendo-se registado, de forma global, aproximadamente 1.8 milhões de mortes por cancro do pulmão. (4)

Entre 2011 e 2017, também em Portugal, houve um aumento da taxa de mortalidade por cancro do pulmão, em ambos os sexos. (5)

Nos países em desenvolvimento, onde o consumo de tabaco continua a aumentar, prevê-se o contínuo crescimento da incidência de cancro do pulmão.

Em Portugal, estima-se que, em cada ano, a sua incidência aumente 0,5%. (1,3) Em 2020, foram reportados cerca de 2.2 milhões de novos casos de cancro do pulmão, em todo o mundo. (4)

As doenças oncológicas, em particular os tumores malignos da traqueia, brônquios e pulmão, representam também as principais causas de anos de vida perdidos em Portugal. (5)

A probabilidade de desenvolver cancro do pulmão durante a vida é estimada em cerca de 8% nos homens e cerca de 6% nas mulheres. (1)

O cancro do pulmão é mais comum entre os 40 e os 80 anos de idade, sendo raro abaixo deste intervalo e gradualmente mais baixo acima do limite superior deste intervalo. (1)

A taxa de sobrevivência aos 5 anos para doentes com cancro do pulmão é de 15%. Este valor prende-se com o facto de o diagnóstico ser muitas vezes feito em estádios avançados da doença, quando existe uma baixa probabilidade da ressecção cirúrgica ser curativa. (2)

### **2.3. Etiologia e Fisiopatologia**

As taxas de incidência e mortalidade por cancro do pulmão refletem o comportamento e escolhas das populações relativamente ao consumo de tabaco. (6)

O consumo de tabaco é apontado como o principal fator de risco para o surgimento de cancro do pulmão, sendo reconhecida uma clara relação de causa-efeito. (2,3) O fumo inalado contém numerosos carcinogéneos, bem como outros agentes capazes de causar inflamação. Estima-se que, em todo o mundo, cerca de 85% dos cancros do pulmão em homens e cerca de 47% em mulheres sejam consequência do consumo de tabaco. (6)

A probabilidade de desenvolvimento de cancro do pulmão é proporcional ao número de anos de exposição ao fumo do tabaco que pode ser quantificado e expresso em UMA (Unidades Maço Ano = n° de cigarros fumados por dia/20 x n° anos). Este risco é tanto mais elevado quanto mais precoce for a idade de início do consumo e revela-se 15 vezes superior em fumadores, comparativamente a não-fumadores. (2,3)

Ex-fumadores apresentam uma diminuição imediata do risco assim que cessam o consumo de tabaco, apesar de este apenas se aproximar do dos não-fumadores passados cerca de 20 anos de abstinência. A cessação tabágica demonstra-se benéfica inclusive para doentes já com diagnóstico estabelecido de cancro do pulmão, uma vez que se associa a uma melhor taxa de sobrevida, a menos efeitos colaterais da terapêutica instituída e a melhor qualidade de vida. (1,3)

A exposição passiva ao fumo do tabaco é também um fator de risco conhecido de desenvolvimento de cancro do pulmão numa grande percentagem de não-fumadores. Estes podem ainda apresentar um risco 30% superior se coabitarem com fumadores. (2)

Outro fator de risco é a exposição a agentes ocupacionais cancerígenos, incluindo, por exemplo, a exposição a asbestos, arsénio, crómio, níquel, radão e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. (2,3) Também neste caso, o simultâneo consumo de tabaco é um fator agravante do risco de desenvolvimento de cancro do pulmão. (2)

Doenças respiratórias, como a doença pulmonar obstrutiva crónica, a tuberculose e todas as restantes patologias que cursam com fibrose do parênquima pulmonar, parecem ser fatores predisponentes de desenvolvimento de cancro do pulmão. Também a infeção por alguns vírus, nomeadamente papiloma vírus e vírus de Epstein-Barr, parece promover a transmissão para as células hospedeiras, de oncogenes víricos envolvidos na carcinogénese do cancro do pulmão. (3)

O mecanismo através do qual cada um destes fatores de risco promove o aparecimento de cancro do pulmão ainda não é bem conhecido, sendo, no entanto, apontada como provável causa as alterações genéticas que estes provocam e que, quando não reparadas, promovem uma transformação das células do epitélio pulmonar e conferem uma vantagem proliferativa às células tumorais, facilitando o seu crescimento, progressão e invasão. (2,6)

Os vários tipos de cancro do pulmão resultam de diferentes mutações oncogénicas, assim como da forma como o meio envolvente das células tumorais favorece o seu crescimento. (2)

Estas complexas alterações genéticas e epigenéticas incluem a perda de alelos, instabilidade cromossómica, mutações em oncogenes e genes supressores tumorais, hipermetilação e consequente silenciamento de genes e, por último, expressão errónea de genes envolvidos no controlo da proliferação celular. (6)

Os proto-oncogenes codificam proteínas que atuam no controlo do ciclo celular, crescimento e diferenciação de células. Alguns exemplos de proto-oncogenes envolvidos na patogénese do cancro do pulmão são a família de genes *ras*, como o *k-ras*, *c-erb*, *rb*, *p53*, *c-myc* e *c-src*. Mutações nos genes *ras* foram detetadas em mais de 50% dos carcinomas de células escamosas e em 68% dos adenocarcinomas. (2)

O desenvolvimento de cancro do pulmão pode também estar relacionado com mutações em genes supressores tumorais, como por exemplo, o *p21*. (2)

O péptido libertador de gastrina, o fator de crescimento semelhante à insulina e o fator de crescimento epidérmico promovem a proliferação de células tumorais através da ativação de vias de sinalização das proteínas quinases. (2)

As populações de células estaminais residentes em determinadas regiões anatómicas do pulmão são capazes de se autorrenovar e formar células pulmonares altamente diferenciadas, nomeadamente células dos epitélios traqueal e alveolar, que substituirão as células lesadas. A destabilização deste processo pode também participar na patogénese de determinados tipos de cancros do pulmão. (2)

## **2.4. Apresentação Clínica**

Como principais manifestações clínicas, os doentes com cancro do pulmão podem apresentar dispneia progressiva, tosse seca ou produtiva, dor ou sensação de opressão torácica, rouquidão ou perda vocal, hemoptises e sintomas constitucionais. Também a ocorrência de pneumonia, especialmente quando recidivante, pode constituir a primeira manifestação de cancro do pulmão. (2,6)

Dentro dos vários tipos de CPNPC, o adenocarcinoma é aquele que mais frequentemente surge de forma assintomática, constituindo muitas vezes um achado incidental em exames de imagem de rotina ou rastreio. Por outro lado, doentes com CPPC referem mais vezes a presença de sintomas relacionados com envolvimento distante metastático. (6)

A presença de uma dor torácica localizada e de características pleuríticas pode sugerir invasão da parede torácica. A manifestação de rouquidão pode ser devida a envolvimento e/ou compressão do nervo laríngeo recorrente esquerdo, o que sugere envolvimento hilar e mediastínico. A apresentação de disfagia, por sua vez, sugere envolvimento do esófago. (2)

O exame físico do doente pode ser normal, mas também pode apresentar algumas alterações na percussão pulmonar, nomeadamente áreas de macicez e/ou alterações na auscultação pulmonar, tais como crepitações e sibilos inspiratórios. Nódulos palpáveis nas regiões cervical e axilar são sugestivos de presença de doença metastática. (2)

Em 9% dos doentes pode ser observado derrame pleural, que pode significar invasão da pleura pelo tumor ou obstrução da drenagem linfática originária dos gânglios mediastínicos. Se o derrame for maligno, a realização da ressecção tumoral fica impedida. (2)

Em menos de 5% dos doentes pode ocorrer envolvimento da veia cava superior e a sua obstrução pode resultar na síndrome da veia cava superior, que se caracteriza por edema da face e das extremidades superiores, devido ao comprometimento do retorno venoso. (2)

A perda não intencional de peso, a dor abdominal e a dor óssea, assim como o aparecimento de distúrbios neurológicos são exemplos de sintomas que se relacionam com doença disseminada e que indicam a provável localização das metástases. Os locais mais comuns de aparecimento de metástases pulmonares são os gânglios linfáticos, juntamente com o fígado, o pâncreas, as glândulas suprarrenais, os rins, o cérebro e o osso. (2,6)

As síndromes paraneoplásicas são comuns no cancro do pulmão, especialmente nos CPPC. Os sintomas podem preceder o diagnóstico de cancro do pulmão em muitos meses ou ser até a primeira manifestação e podem ser de vários foros, nomeadamente endocrinológico, neurológico e musculoesquelético. A hipercalcemia é um achado quase patognomónico de carcinoma escamoso e resulta da produção ectópica da hormona paratiroideia (PTH), sendo uma alteração metabólica ameaçadora da vida que cursa com náuseas, vômitos, dor abdominal, obstipação, poliúria, polidipsia e alteração do estado de consciência. O hipocratismo digital ocorre em cerca de 30% dos casos, especialmente em CPNPC, e a osteoartropatia hipertrófica em até 10% dos casos, nomeadamente em adenocarcinomas. (1,6)

## **2.5. Cancro do Pulmão de Não-pequenas Células**

Os CPNPC representam a maioria dos casos de cancro do pulmão, destacando-se os adenocarcinomas e os carcinomas escamosos como os mais comuns. (2)

No momento do diagnóstico, apenas 20-25% dos doentes apresentam a doença num estadio precoce e recorrem a intervenção cirúrgica com intuito curativo. A grande maioria dos casos apresenta-se já num estadio avançado da doença, sendo as principais estratégias terapêuticas adotadas, a quimioterapia, a terapêutica alvo e a imunoterapia. (7)

O estadiamento anatómico dos CPNPC é feito de acordo com a classificação TNM do Sistema Internacional de Estadiamento do Cancro do Pulmão: doença precoce, não metastática (estádios IA-IIIa), doença localmente avançada, confinada à cavidade torácica (estadio IIIB) ou doença metastática, fora da cavidade torácica (estadio IV). À medida que a doença progride, as taxas de sobrevivência diminuem significativamente. (7)

### **2.5.1. Adenocarcinoma do Pulmão**

Os adenocarcinomas representam o tipo mais comum de cancro pulmonar e também o tipo que mais comumente afeta não-fumadores, correspondendo a cerca de 20% dos casos totais. (2)

A grande maioria dos adenocarcinomas localiza-se preferencialmente na zona periférica do pulmão, constituindo formações nodulares únicas ou múltiplas com uma grande diversidade de tamanhos. Em cerca de 15% dos casos, ocorre envolvimento da pleura e da parede torácica. Estes tumores podem também associar-se, em 60% dos casos, a derrames pleurais malignos e têm uma elevada propensão para metastizar à distância. (2,6)

As células deste tipo de cancro diferenciam-se em estruturas glandulares e podem produzir mucina. Os adenocarcinomas distinguem-se em vários subtipos consoante os padrões que apresentam: acinares, papilares, broncoalveolares, sólidos com produção de mucina ou ainda o subtipo mais comum, uma mistura de todos os anteriores. (1,2,6)

Os carcinomas broncoalveolares são a forma mais comum de cancro do pulmão encontrada em jovens e não-fumadores. As suas células crescem e invadem as paredes alveolares pré-existentes, podendo este subtipo apresentar-se como um infiltrado pulmonar ou como um nódulo solitário, associado a broncorreia. (2)

Histologicamente, as características das células tumorais variam de acordo com o seu subtipo e grau de diferenciação. A expressão de marcadores epiteliais é típica, pelo que coram positivo para o antigénio carcinoembriogénico (CEA). Podem corar positivo também para o fator de transcrição da tiroideia (TTF-1) ou para a apoproteína surfactante. (2,6)

Nos exames de imagem, mais concretamente na tomografia computadorizada (TC), os adenocarcinomas são identificados através de vários padrões, nomeadamente nódulos sólidos, opacidades em vidro despolido e a mistura dos dois. Uma maior proporção do componente sólido em detrimento do padrão em vidro despolido sugere um crescimento invasivo acompanhado de um prognóstico menos favorável. (6)

De uma forma geral, os adenocarcinomas respondem mal à terapêutica e apresentam um mau prognóstico. (2)

### **2.5.2. Carcinoma Pulmonar Escamoso**

As células epiteliais cilíndricas sofrem metaplasia, transformando-se em células epiteliais escamosas atípicas, o que origina a formação de um carcinoma escamoso. Este começa por ser localizado (*carcinoma in situ*), sofrendo disseminação intraepitelial com ou sem invasão subepitelial. Outro padrão de disseminação que os carcinomas escamosos podem apresentar é o crescimento tumoral endobrônquico de uma lesão polipóide. (2,6)

60 a 80% dos carcinomas escamosos tende a localizar-se nas vias aéreas centrais, podendo provocar a obstrução do seu lúmen, o que conseqüentemente leva a estase das secreções brônquicas, atelectasia pulmonar, dilatação brônquica e pneumonia. É também comum ocorrer necrose e formação de cavitações neste tipo de cancro. (2,6)

Caso o carcinoma se localize no ápex do pulmão e invada as estruturas adjacentes, pode ser apelidado de tumor de Pancoast. Os achados físicos apresentados e os sintomas manifestados diferenciam-se consoante as estruturas adjacentes envolvidas, podendo provocar destruição das costelas posteriores ou síndrome de Horner, pela invasão da cadeia de gânglios simpáticos cervicais. (2,6)

Histologicamente, os carcinomas escamosos podem ser distinguidos dos restantes CPNPC pela deposição concêntrica de queratina, que forma as apelidadas “pérolas de queratina” e pela formação de pontes intercelulares. A presença destas características difere consoante o grau de diferenciação tumoral, sendo mais frequente em tumores altamente diferenciados. (2,6)

Na avaliação imuno-histoquímica, este tipo de cancro expressa, na sua maioria, queratina de elevado peso molecular (34βE12), citoqueratinas 5/6 e CEA. (6)

Estes tumores tendem a ser localmente agressivos, envolvendo estruturas adjacentes por contiguidade direta e apresentam uma baixa velocidade de crescimento pelo que a sua propensão para metastizar é muito baixa. No entanto, a recorrência locorregional após ressecção cirúrgica é comum. (2,6)

### **2.5.3. Carcinoma de Grandes Células**

O carcinoma de grandes células corresponde a aproximadamente 9% dos casos de cancro do pulmão e divide-se em dois subtipos: carcinoma de células gigantes, um tumor anaplásico, com uma sobrevida média inferior a um ano e o carcinoma de células claras, um tumor semelhante ao carcinoma de células renais, mas com menos manifestações malignas. (2,6)

Os carcinomas de grandes células constituem frequentemente uma lesão periférica e podem associar-se a pneumonite e adenopatias hilares ou mediastínicas. (2,6)

O seu diagnóstico é de exclusão e, histologicamente, apresentam células grandes poligonais com nucléolos proeminentes, sendo tumores pouco diferenciados que se distanciam das apresentações típicas dos restantes CPNPC e CPPC. (2,6)



### 3. Imunoterapia

A cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia constituem formas tradicionais de tratamento do CPNPC. No entanto, o diagnóstico é frequentemente feito num estadio avançado da doença, em que o tratamento apresenta uma toxicidade elevada e uma eficácia limitada, pelo que, nestes casos, o prognóstico continua a não ser o desejado. (8,9)

Recentemente, surgiram novas e inovadoras modalidades terapêuticas, como a terapêutica alvo e a imunoterapia. (8,9) Esta última consiste na reativação do sistema imunológico, através da inibição de *checkpoints*. (10)

Um dos exemplos mais representativos da imunoterapia são os inibidores dos *checkpoints* imunitários (ICIs), que incluem inibidores da proteína 1 da morte celular programada (PD-1) e do seu ligante (PD-L1) e, ainda, do antígeno 4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4). (8,9)

A PD-1 pertence à família CD28 e é um recetor de um *checkpoint* imunitário expresso em várias células imunes, incluindo células T e B ativas, células dendríticas e células NK (*Natural Killer*). O seu principal ligante, PD-L1, é expresso de forma constitutiva em vários tipos de células tumorais, na tentativa destas se evadirem do reconhecimento imunológico pelas células T. (11,12)

Este eixo PD-1/PD-L1 é responsável por inibir a proliferação de linfócitos T, a produção de citocinas e a atividade citolítica, o que numa situação de normalidade é importante para manter a tolerância imunológica e prevenir processos autoimunes. No entanto, na presença de células tumorais, este efeito imunossupressor permite que o tumor progrida e cresça de forma incontrolada. Desta forma, a aplicação de inibidores neste eixo permite que a resposta imunológica contra o tumor seja restabelecida e fortalecida, sendo este o fundamento das estratégias de imunoterapia. (10–12)

O CTLA-4 é também um membro da família de recetores CD28 e neutraliza a interação entre a proteína CD28, expressa na superfície de células T *naïve*, e os ligantes B7 presentes na superfície das células apresentadoras de antígenos, tendo um papel importante na supressão da ativação e proliferação das células T. (11)

O anticorpo anti-CTLA-4, denominado ipilimumab, liga-se ao CTLA-4 nos linfócitos T reguladores bloqueando o seu efeito na interação CD28-B7 e, concomitantemente, liga-se a outras células T contribuindo para a sua ativação e proliferação. Este inibidor apresenta um efeito favorável em tumores com uma elevada carga mutacional tumoral. (11)

A crescente utilização destes inibidores, tais como o atezolizumab, o cemiplimab, o durvalumab, o ipilimumab, o nivolumab e o pembrolizumab, nos CPNPC em estádios III e IV, como primeira ou segunda linha terapêutica, em monoterapia ou em combinação com outros inibidores de *checkpoints* ou quimioterapia, melhorou a sobrevida global, com quase um terço dos doentes vivos aos 5 anos após o diagnóstico e promoveu respostas mais duradouras. (10,11,13)

No entanto, em populações de pacientes não especificamente selecionados para realizar este tipo de tratamento, verificou-se que a taxa de resposta permanece baixa, aproximando-se dos 20%, enquanto, pelo contrário, o custo associado permanece elevado. (9)

## 4. Biomarcadores

Entende-se por biomarcadores preditivos todas as características que podem afetar e prever a eficácia de um tratamento específico instituído numa determinada população de doentes, neste caso com CPNPC. (14)

Existem diversos biomarcadores, alguns relacionados com o próprio tumor, como são exemplos o PD-L1 e a carga mutacional tumoral, outros ligados ao microambiente tumoral, como é o caso dos linfócitos infiltrantes no tumor (TILs) e, por fim, biomarcadores derivados do hospedeiro, tais como a microbiota intestinal. (15)

Os dois biomarcadores mais estudados até hoje são a expressão de PD-L1 e a carga mutacional tumoral. (13)

### 4.1. Ligante da Proteína 1 da Morte Celular Programada

Atualmente, PD-L1 é o único biomarcador oficialmente aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e testado na prática clínica para selecionar os pacientes que mais beneficiarão de imunoterapia. (8,9,13)

No CPNPC, a expressão de PD-L1 associa-se a um grande aumento da sobrevida global dos doentes a realizar terapêutica com ICIs, sendo este aumento tanto maior quanto maior for a expressão de PD-L1. (11,13)

Quatro ensaios clínicos defendem que a testagem de PD-L1 é um ótimo biomarcador para selecionar os doentes que mais poderão beneficiar do uso de ICIs como terapêutica de primeira linha. No estudo KEYNOTE-024, doentes que apresentavam tumores com uma alta expressão de PD-L1 ( $\geq 50\%$ ), tratados, em primeira linha, com pembrolizumab, exibiram uma melhoria da sobrevida, em comparação com doentes submetidos a quimioterapia. Também no estudo KEYNOTE-042, uma expressão de PD-L1  $\geq 1\%$  se associou a uma melhor sobrevida dos doentes tratados com pembrolizumab. Uma análise adicional revelou que este aumento da sobrevida era essencialmente devido ao subgrupo de pacientes com uma alta expressão de PD-L1 ( $\geq 50\%$ ). O terceiro estudo, denominado IMpower110, relatou um progresso na taxa de sobrevida dos doentes tratados com atezolizumab, limitado ao subgrupo de tumores com uma elevada expressão de PD-L1. Por último, o ensaio EMPOWER-lung 1 registou igualmente uma melhoria da sobrevida em

doentes tratados com outro inibidor da PD-1, cemiplimab, cujos tumores apresentam uma expressão de PD-L1  $\geq 50\%$ . (13)

No decorrer destes estudos, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) aprovou o uso de pembrolizumab como primeira linha de tratamento em tumores com uma alta expressão de PD-L1. Ao mesmo tempo, a FDA aprovou o uso de pembrolizumab em tumores com uma expressão de PD-L1  $\geq 1\%$  e de atezolizumab em tumores que apresentem uma elevada expressão de PD-L1. (11,13)

Adicionalmente, na primeira parte do estudo CheckMate 227, concluiu-se que a combinação de nivolumab e ipilimumab se associava, em 33% dos doentes, a uma sobrevida global de três anos. Apesar deste benefício ser registado tanto na população com uma expressão de PD-L1  $\geq 1\%$ , como naquela com uma expressão  $< 1\%$ , verificou-se que na primeira, esta melhoria era conseguida sobretudo nos doentes com tumores com uma elevada expressão do ligante. Em maio de 2020, a FDA aprovou também esta combinação como uma possível terapêutica de primeira linha em tumores com uma expressão de PD-L1  $\geq 1\%$ . (13)

No entanto, este ligante tem uma expressão quer espacial, quer temporal, muito heterogénea. Existe um conjunto de doentes que não beneficiam do uso de ICIs, apesar de terem tumores com uma elevada expressão de PD-L1, assim como pacientes com uma baixa expressão deste ligante que respondem ao tratamento com ICIs, o que sugere que o uso isolado de PD-L1 para fazer esta seleção não parece ser suficiente. (8,9,13)

#### **4.2. Carga Mutacional Tumoral**

O número total de mutações somáticas por Megabase (Mb) da região codificante do genoma tumoral corresponde à carga mutacional de um tumor. A acumulação destas mutações resulta na formação de novos antígenos tumorais. Estes neoantígenos são epítomos específicos para tumores, que podem ser apresentados na superfície da célula tumoral pelo complexo major de histocompatibilidade (MHC). (8,9,13)

Uma parte destes neoantígenos é reconhecida como estranha ao organismo, induzindo uma resposta imunológica dependente de células T. As moléculas responsáveis pelos *checkpoints* imunitários na superfície da célula tumoral conseguem inibir a ativação das células T, suprimindo a resposta imunológica e permitindo que o tumor progrida. Os ICIs, como o anti-PD-1 e o anti-PD-L1, conseguem reverter este processo, contribuindo para a erradicação das células tumorais. (8,9)

Tumores que apresentam um elevado número de neoantígenos respondem melhor aos ICIs. Uma vez que a carga mutacional tumoral atua como medida indireta dos neoantígenos tumorais, podemos considerá-la um potencial biomarcador para estratificação de pacientes sensíveis à imunoterapia. (9)

O ensaio CheckMate 026 demonstrou que doentes com uma elevada carga mutacional tumoral, mais precisamente com mais de 243 mutações quantificadas pelo método WES (*Whole Exome Sequencing*), adquirem uma maior taxa de resposta ao nivolumab e uma sobrevida livre de progressão mais longa. Paralelamente e, apesar de não se ter estabelecido uma associação relevante entre a carga mutacional tumoral e a expressão de PD-L1, pacientes que apresentavam os dois biomarcadores, isto é, uma elevada carga mutacional tumoral, assim como uma elevada expressão de PD-L1, obtiveram o maior benefício com o tratamento com nivolumab. (13)

Pacientes com CPNPC PD-L1-positivos, com uma alta carga mutacional tumoral (mais de 175 mutações quantificadas pelo método WES), tratados com pembrolizumab em monoterapia apresentaram resultados clínicos satisfatórios, segundo um outro estudo, denominado KEYNOTE 042. (13)

*Nan et al.* sugerem, na sua revisão sistemática e meta-análise datada de 2021, que incluiu 11 estudos, que a sobrevida livre de progressão da doença, a taxa de resposta ao tratamento e a sobrevida global apresentam uma significativa melhoria em doentes com CPNPC e uma elevada carga mutacional tumoral, quando comparados aos que apresentam uma carga baixa. Perante o facto destes doentes adquirirem benefícios a longo prazo, admitiu-se que a carga mutacional tumoral é um biomarcador eficaz, com alguma fiabilidade, capaz de prever e estratificar os pacientes que mais beneficiarão do tratamento com ICIs. (9)

No presente ano de 2022, também a revisão sistemática e meta-análise efetuada por *Meng et al.*, que incluiu 28 estudos, validou estas mesmas conclusões. Uma elevada carga mutacional tumoral, associa-se a maiores taxas de sobrevida global e de resposta à terapêutica, assim como a uma favorável sobrevida livre de progressão, sendo o subgrupo de pacientes tratados apenas com inibidores do PD-L1 uma exceção, neste último parâmetro. Análises adicionais demonstraram que, apesar de não existir ainda um consenso relativamente ao valor de carga mutacional tumoral que deva ser assumido como limiar para discriminar os doentes mais sensíveis à imunoterapia, um *cutoff* mais baixo seria mais discriminatório. (8)

Atualmente, o papel da carga mutacional tumoral nas decisões terapêuticas de doentes com CPNPC gera ainda alguma controvérsia, especialmente devido à fraca reprodutibilidade de resultados entre os vários laboratórios. (13)

A carga mutacional tumoral é altamente dinâmica, podendo ser diferente no tumor primário e nas metástases. De facto, pode ainda ser heterogénea dentro da mesma lesão. (7)

Outro problema que pode surgir no decorrer desta avaliação é o número de células presentes em pequenas biópsias poder ser insuficiente para chegar a um correto valor de carga mutacional tumoral. Para além disso, a heterogeneidade do tumor pode ser amplificada pela quimioterapia e radioterapia, o que pode modificar a carga mutacional em vários locais do tumor. (7)

### **4.3. Mutações Genéticas**

Algumas mutações contribuem para a génese e progressão tumorais, mas podem também aumentar a hipótese de o sistema imunológico do hospedeiro reconhecer o tumor e promover a sua eliminação. (4)

Mutações genéticas no gene supressor tumoral STK11/LKB1 (*Serine/threonine kinase 11*) e no gene KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) associam-se à aquisição de resistência à monoterapia com inibidores da PD-1 e do PD-L1, enquanto mutações no gene ARID1A (*AT-rich interactive domain-containing protein 1A*) se associam a uma maior sensibilidade a esta terapêutica. (13)

As mutações nos genes STK11/LKB1 e KEAP1 afetam o mecanismo regulador da expressão de PD-L1 no tumor e correlacionam-se com uma má resposta aos ICIs. (11,13) Para além disso, o subgrupo de doentes com mutações quer no gene STK11/LKB1, quer no gene KEAP1 apresentam um curso clínico da doença mais agressivo, com uma resistência superior ao tratamento com ICIs. (11)

No ensaio MYSTIC, uma sobrevida global mais baixa foi relatada em doentes com mutações nos genes STK11/LKB1 ou KEAP1, que tenham realizado qualquer uma das modalidades de tratamento disponíveis, quando comparados com doentes com genes STK11/LKB1 ou KEAP1 *wild-type*. Por outro lado, doentes com a mutação ARID1A apresentaram uma maior infiltração linfocitária e uma sobrevida global em média mais longa do que pacientes com o gene ARID1A *wild-type*, quando tratados com ICIs. Desta forma, as mutações nos genes

STK11 e KEAP1 podem ser consideradas prognósticas e a mutação no gene ARID1A um biomarcador preditor. (13)

As mutações no gene KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) estão ligadas a uma elevada carga mutacional tumoral e a uma também elevada expressão de PD-L1. (13) Para além destas características, a ocorrência simultânea destas mutações e de mutações no gene TP53 associa-se também a uma infiltração marcada de células T e reflete uma resposta favorável aos ICIs. (11) Por outro lado, caso se verifique a ocorrência simultânea de mutações nos genes KRAS e STK11, estas podem ser preditivas de uma resistência primária aos ICIs. (16)

Segundo o estudo KEYNOTE-001, doentes com mutações no gene KRAS, em comparação com pacientes com genes KRAS *wild-type*, tiveram um grande benefício clínico com a utilização dos agentes nivolumab ou pembrolizumab, em monoterapia. (11) Também no decorrer do ensaio KEYNOTE-042, o papel das mutações no gene KRAS pareceu ser preditivo de uma taxa de resposta numericamente superior, assim como de uma sobrevida média livre de progressão e de uma sobrevida global mais longas. Desta forma, a presença destas mutações parece prever melhores resultados terapêuticos dos ICIs. (16)

Uma disfunção do gene TP53 pode resultar na acumulação de mutações e, consequentemente, numa carga mutacional tumoral alta. Para além disso, estas mutações aumentam a expressão de recetores dos *checkpoints* imunitários e induzem a ativação das células T, pelo que se correlacionam com uma sobrevida global elevada em doentes com CPNPC em estadio avançado. Publicações recentes sugerem ainda que mutações simultâneas nos genes TP53 e KMT2C (*Lysine Methyltransferase 2C*) conferem uma resposta favorável aos ICIs. (16)

Os CPNPC com mutações no gene que codifica o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) ou no gene ALK (*anaplastic lymphoma kinase*) exibem uma menor infiltração de células T e uma carga mutacional mais baixa, o que resulta numa pior resposta à terapêutica com ICIs, acompanhada de uma menor taxa de sobrevida livre de progressão. No entanto, é de ressaltar que o estudo ATLANTIC alertou para o facto de não deverem ser excluídos pacientes, candidatos à terapia com ICIs, por apresentarem mutações nos genes EGFR ou ALK, especialmente se apresentarem um nível elevado de expressão de PD-L1, uma vez que, mesmo nestes doentes, estes níveis elevados podem associar-se a boas respostas e sobrevida livre de progressão. (11)

A eficácia clínica do tratamento com ICIs em casos de CPNPC com mutações no gene BRAF (*B-Raf Proto-Oncogene*) é similar à dos casos de CPNPC sem uma mutação específica associada e é superior quando estes são administrados em segunda ou outras linhas terapêuticas superiores. Esta mutação está ligada a uma maior carga mutacional tumoral, comparativamente ao gene BRAF *wild-type*, e a uma sobrevida livre de progressão de aproximadamente 10 meses. (11,16)

De acrescentar que mutações nos genes RTK (*Receptor tyrosine kinases*) se relacionam com uma resistência primária aos ICIs, independentemente da expressão de PD-L1 e da carga mutacional tumoral. (11)

As caderinas atípicas FAT 1, 2, 3 e 4, proteínas membranares que contêm sequências de repetição de caderina, são codificadas por uma família de genes que mostrou ter capacidade de prever o benefício clínico da instituição de terapêutica com ICIs em pacientes com CPNPC. (17)

Mutações nos genes FAT são comuns em doentes com CPNPC, sendo a mutação no gene FAT3 a que expressa maior frequência, quer em adenocarcinomas, quer em carcinomas pulmonares escamosos, seguida das mutações FAT4, FAT1 e, por fim, FAT2. (17)

Doentes com adenocarcinomas do pulmão, que revelaram ter a mutação no gene codificador da proteína FAT2, apresentaram tanto uma sobrevida global longa, como uma maior sobrevida livre de progressão da doença, tendo-se verificado ainda que uma elevada expressão desta mutação se correlacionava também com uma alta expressão de PD-L1. (17)

As mutações FAT 1, 2, 3 e 4 estão também ligadas a elevadas cargas mutacionais tumorais e demonstraram ter efeito na regulação do recrutamento e infiltração de células imunes, em particular nos adenocarcinomas. (17)

Perante os dados expostos, concluiu-se que doentes com CPNPC com mutações nos genes FAT 1, 2 e 3 tinham uma maior probabilidade de responder positivamente ao tratamento com ICIs, enquanto aqueles que apresentavam mutações no gene FAT 4, apesar de revelarem uma taxa de resposta ao tratamento melhorada, não viram a sua sobrevida alterada pela imunoterapia. (17)

A presença concomitante das mutações nos genes FAT 3 e LRP1B (*LDL Receptor Related Protein 1B*), um gene supressor tumoral, demonstrou poder aumentar a carga mutacional tumoral, a citotoxicidade e imunogenicidade, assim como facilitar a infiltração linfocitária, o que influencia significativamente o resultado da imunoterapia. Assim, a comutação dos

genes FAT 3 e LRP1B tem um perfil muito promissor como biomarcador para rastrear os candidatos ao tratamento com ICIs, especialmente no caso dos adenocarcinomas pulmonares, tendo já exibido uma forte associação com uma sobrevida livre de progressão prolongada. (4)

O gene codificador da PTPRT (*Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type T*), significativamente mutado nos carcinomas pulmonares escamosos, pode ser considerado um bom indicador de avaliação da eficácia da imunoterapia nos CPNPC, uma vez que a sua mutação se relaciona com um prolongamento da sobrevida e uma melhor taxa de resposta ao tratamento. (18)

A PTPRT tem funções essencialmente fosforilativas, sendo um mediador crítico na imunidade dependente de células T, na sinalização da PD-1 e na apresentação de antígenos. No decorrer de alguns estudos, as mutações no gene PTPRT indicaram estar relacionadas com um prognóstico favorável do tratamento com ICIs. (18)

Por último, mutações no gene supressor tumoral MGA, codificador da proteína de dimerização MAX, mostraram estar também associadas com taxas superiores de resposta à imunoterapia, assim como respostas mais duradouras, que proporcionam maiores sobrevidas. (19)

#### **4.4. Microambiente Tumoral e Linfócitos Infiltrantes no Tumor**

O microambiente tumoral consiste numa população heterogénea de células neoplásicas, células imunes, vasos, estroma, mediadores da sinalização celular e proteínas da matriz extracelular. Este tem um papel crucial na imunogenicidade, uma vez que está envolvido nas múltiplas interações entre as células tumorais e o sistema imunológico. O facto de o tumor estar envolvido num ambiente cronicamente inflamatório pode alterar a diferenciação das células imunes, favorecendo a evasão tumoral e, conseqüentemente, a resistência aos ICIs. (16,20)

Baseado na presença de células imunes moduladoras, tais como os linfócitos T reguladores, células supressoras derivadas da linhagem mieloide e macrófagos, responsáveis por induzir um ambiente imunossupressor e pouco responsivo à imunoterapia, o microambiente tumoral pode representar um biomarcador da sensibilidade aos ICIs. (20)

Podem distinguir-se dois subtipos de tumores de acordo com a presença ou ausência de genes moduladores do microambiente tumoral: os tumores quentes e os frios. Os primeiros são caracterizados pela presença marcada de TILs, macrófagos e células dendríticas, que tornam o tumor potencialmente responsivo à imunoterapia e, por conseguinte, estão associados a uma sobrevida mais longa. Os tumores frios, pelo contrário, apresentam uma baixa quantidade de TILs que se relaciona com uma eficácia limitada dos ICIs. (16,20)

Alguns estudos demonstraram que níveis elevados de células T reguladoras que expressam PD-1 ou de células supressoras derivadas da linhagem mieloide se relacionam com piores resultados terapêuticos, podendo constituir biomarcadores adicionais da resposta aos ICIs. (15,20,21)

Da mesma forma, uma baixa contagem de células T CD8+ que expressam PD-L1, bem como uma diminuta contagem de macrófagos M2 que expressam as proteínas CD68 e CD163 foram preditoras de uma resposta positiva em doentes tratados com ICIs. Ademais, a contagem aumentada de neutrófilos no microambiente tumoral, por se relacionar com uma contagem inversa de células T, no decorrer de vários ensaios realizados, mostrou estar ligada a uma resistência ao tratamento com anti-PD-1. (15,20)

A expressão de PD-1 nas células T refletem a ativação do eixo PD-1/PD-L1 e as células T CD8+ que expressam esta proteína associam-se a um bom prognóstico, enquanto as células T CD4+ que expressam a PD-1 estão relacionadas com um pior resultado clínico após o tratamento com anti-PD-L1. Desta forma, quanto mais alto o *ratio* CD8+PD-1+/CD4+PD-1+, denominado PERLS, for, melhor será o prognóstico do doente. (22)

Ainda relativamente ao microambiente tumoral, *Higgs et al.* identificaram que a positividade para o gene do interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), uma potente citocina antitumoral secretada pelos linfócitos T citotóxicos, células NK, entre outras células imunológicas, corresponde a maiores taxas de resposta, de sobrevida livre de progressão e de sobrevida global em doentes tratados com um anti-PD-L1, o durvalumab. (15,20,23)

Por último, doentes com CPNPC metastático com níveis iniciais diminuídos de interleucina 5 (IL-5), produzida essencialmente por leucócitos, nomeadamente células T, eosinófilos e basófilos, estão ligados à obtenção de resultados clínicos positivos e uma longa sobrevida livre de progressão após tratamento com anti-PD-1. (23)

#### **4.5. Células tumorais circulantes, células sanguíneas periféricas e DNA livre de células circulantes**

A inflamação contribui para a patogénese e progressão do cancro. Marcadores séricos de inflamação sistémica como a contagem absoluta de neutrófilos (CAN), o rácio neutrófilos-linfócitos (RNL) e o rácio plaquetas-linfócitos (RPL) são considerados potenciais biomarcadores para prever a sobrevida de doentes com cancro, nomeadamente CPNPC. (24)

Também a análise de DNA tumoral livre de células circulantes (ctDNA) pode fornecer várias informações sobre a evolução do cancro, uma vez que este é libertado pelas células tumorais mortas e é rapidamente eliminado do sangue. (24)

Posto isto, valores baixos dos rácios neutrófilos-linfócitos e plaquetas-linfócitos, assim como níveis basais diminuídos de ctDNA e uma contagem diminuta de células tumorais circulantes durante o tratamento, refletem uma elevada sobrevida global e livre de progressão da doença. (24)

Em suma, a análise simultânea da contagem de células tumorais circulantes, de células sanguíneas periféricas e seus marcadores séricos de inflamação sistémica, bem como dos níveis de ctDNA no início e ao longo do tratamento, podem ajudar a estratificar os pacientes de acordo com a sua provável resposta aos ICIs e prever a ocorrência de progressão da doença, especialmente o desenvolvimento de metástases extratorácicas. (24)

#### **4.6. Proteína C Reativa**

Uma elevação precoce dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6) ou o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), após o início da terapêutica, é considerada o estímulo principal da produção hepática da proteína C reativa (PCR) e relaciona-se com a resposta aos ICIs. (25)

De forma a estratificar a cinética da PCR após o início da imunoterapia, a sua resposta máxima define-se pelo aumento de, pelo menos, duas vezes o nível basal de PCR nos primeiros 30 dias de tratamento, seguido de uma diminuição até um nível abaixo do basal. Considera-se ainda uma resposta positiva da PCR, uma queda de 30% do seu nível sérico até valores abaixo do seu basal, num período de 12 semanas após a instituição do tratamento. (25)

Esta cinética da PCR pode ser facilmente determinada, através de um método não invasivo e com um elevado custo-benefício, podendo prever a resposta à imunoterapia apenas 4 semanas após o seu início, com potencial para, a partir daí, otimizar imediatamente a terapêutica. (25)

Provou-se que, em doentes que tinham recebido a primeira linha de tratamento com um anti-PD-1 em monoterapia, a cinética da PCR apresentou uma forte associação com uma melhor sobrevida global e livre de progressão da doença. (25)

#### **4.7. Score Albumina-Bilirrubina (ALBI)**

O score albumina-bilirrubina (ALBI) é calculado através da medição dos níveis de albumina e bilirrubina no sangue, que permitem uma avaliação adequada da função hepática. (26)

A albumina liga-se à prostaglandina E2, ativando-a e reduz a expressão de TNF- $\alpha$ , resultando numa supressão imunológica. A hipoalbuminemia associa-se a pior prognóstico em doentes com CPNPC tratados com ICIs. Estudos prévios demonstraram que também a bilirrubina está envolvida em múltiplas atividades biológicas e exerce poderosas funções imunomoduladora e anti-inflamatória, inibindo nomeadamente as respostas das células T. Deste modo, estes papéis quer da albumina, quer da bilirrubina contribuem para uma sobrevida livre de progressão mais baixa, bem como uma menor sobrevida global em doentes com CPNPC que tenham realizado tratamento com ICIs. (26)

Alguns estudos concluíram, assim, que o ALBI é clinicamente útil para prever tanto a sobrevida livre de progressão, como a sobrevida global, especialmente em pacientes com CPNPC com um baixo *performance status* (PS) ou cujo nível de expressão de PD-L1 não é conhecido. (26)

#### **4.8. Proteína Amiloide A Sérica**

Alguns dados clínicos recentes sugerem que a imunoterapia pode ser mais eficaz perante um tumor com elevados componentes inflamatórios. Na verdade, a capacidade que esta tem de modificar de forma favorável o microambiente tumoral aumenta a probabilidade de resposta ao tratamento. (27)

A proteína Amiloide A sérica (SAA) é uma proteína de fase aguda que exibe uma importante atividade pró-inflamatória, induzindo a síntese de várias citocinas, promovendo a quimiotaxia de monócitos e neutrófilos e atuando como uma apolipoproteína da lipoproteína de alta densidade (HDL), envolvida no transporte reverso de colesterol em situações inflamatórias. (27)

No caso de pacientes oncológicos, níveis elevados desta proteína não estão apenas relacionados com a inflamação fisiológica associada ao cancro, mas, tendo em conta as propriedades imunomoduladoras da SAA, podem refletir também uma produção local que afeta negativamente a função das células T e que serve de mecanismo de evasão imunológica. (27)

No estudo desenvolvido e liderado por Vincenzo Di Noia, também denominado FoRECAT, chegou-se à conclusão de que doentes com um nível basal baixo de SAA apresentavam uma maior probabilidade de responderem ao pembrolizumab como terapêutica de primeira linha, quando comparados a doentes com níveis pré-tratamento de SAA mais elevados. Adicionalmente, demonstrou-se que níveis baixos de SAA se relacionavam também com uma sobrevida livre de progressão mais longa, bem como uma maior sobrevida global. No entanto, este ensaio apresenta algumas limitações que o impedem de emitir uma conclusão definitiva sobre o papel deste biomarcador. (27)

#### **4.9. Microbiota Intestinal**

Um indivíduo saudável pode albergar cerca de 300 a 500 espécies de bactérias diferentes na sua microbiota gastrointestinal. No entanto, a disbiose intestinal pode desempenhar um papel crítico, embora ainda mal definido, na resposta clínica a algumas terapias, como é o caso da imunoterapia com ICIs. Na base deste processo poderá estar a estimulação de células dendríticas intestinais e de células T circulantes por um grupo específico de bactérias intestinais. São esperados alguns resultados nesta área, nomeadamente através do estudo MITRE, cujo principal objetivo é avaliar prospectivamente e validar a forma como a microbiota intestinal pode prever a eficácia dos ICIs. (28)

Apesar de algo controverso, alguns estudos indicam que a microbiota intestinal pode ainda ser alterada pela toma de medicamentos, como antibióticos ou inibidores da bomba de prótons (IBPs), o que, conseqüentemente, terá um efeito cumulativo na resposta imunológica aos ICIs. (14)

Routy et al. conduziram um estudo que mostrou uma importante implicação dos antibióticos, que afetam a microbiota intestinal, na resposta aos ICIs. Doentes que apresentaram uma resposta favorável, tinham também um nível elevado da bactéria *Akkermansia muciniphila* na sua microbiota e, quando esta foi transplantada em ratos, demonstrou aumentar os efeitos antitumorais dos inibidores da PD-1. (14,29)

Num outro ensaio, desta vez da responsabilidade de Chalabi et al., e numa análise retrospectiva italiana, a utilização profilática de antibióticos sistémicos ou de IBPs pareceu estar ligada a um aumento da progressão da doença e, por sua vez, a um pior resultado da imunoterapia, sugerindo que estes podem ter um papel como fatores preditores da eficácia dos ICIs. (14)

Existe evidência de que uma elevada abundância de *Alistipes*, *Anaerostipes*, *Desulfovibrio*, *Faecalibacterium* e *Bifidobacterium* na microbiota intestinal se associa a uma melhor resposta aos agentes anti-PD-1, bem como a uma sobrevida livre de progressão mais prolongada. Esta associação parece dever-se ao facto destes microrganismos melhorarem a resposta imunológica sistémica, através da amplificação da apresentação de antigénios e da função efetora das células T na periferia e no microambiente tumoral. Também *Jin et al.* corroboraram estes achados ao identificar respostas clínicas aos ICIs, em casos de CPNPC, associadas a uma abundância relativa de *Alistipes putredinis*, *Bifidobacterium longum*, *Prevotella copri* e *Ruminococcus*. (29,30)

Pacientes com um PS melhor parecem de alguma forma recorrer a um mecanismo que aumenta a presença dos microrganismos supracitados na sua microbiota e, assim, melhorar a resposta aos anti-PD-1, estando mais propensos a serem recomendados para esta modalidade de tratamento. (30)

Através do regulamento da função das células dendríticas e da diferenciação das células T auxiliares, um outro microrganismo, *Bacteroides fragilis*, demonstrou relacionar-se com uma elevada eficácia do tratamento com anti-CTLA-4. A presença de *Phascolarctobacterium* está diretamente ligada a uma maior sobrevida livre de progressão, contrariamente à presença de *Dialister* que, pelos seus efeitos anti-inflamatórios e sendo considerado um biomarcador prognóstico independente, mostrou associar-se à progressão do CPNPC em doentes a receber imunoterapia. (29)

Para além dos microrganismos, também os metabolitos derivados da fermentação da dieta, como os ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), quando em elevadas concentrações, confirmaram ter uma influência na resposta clínica aos ICIs, por auxiliarem a regulação da resposta imunológica, constituindo fatores preditores da eficácia da imunoterapia nos doentes com CPNPC. (29)



## 5. Conclusões Finais e Perspetivas Futuras

Os inibidores da PD-1 ou do PD-L1 apresentaram excelentes efeitos terapêuticos contra tumores que expressam níveis elevados de PD-L1 ( $\geq 50\%$ ) e/ou uma elevada carga mutacional tumoral. No entanto, estes indicadores não são suficientes para prever uma resposta ou um resultado clínico perante o uso de ICIs como principal terapêutica. (11) A expressão de PD-L1 e a carga mutacional tumoral podem ser incorporados em modelos preditivos com múltiplas variáveis, de modo a terem um valor preditivo superior. (7)

O uso ótimo das várias opções de tratamento é uma das questões mais relevantes na área da imunoterapia. Um conhecimento mais profundo da relação entre mutações genéticas e distintos fenótipos imunológicos dos CPNPC irá ajudar na seleção daqueles que melhor responderão ao tratamento com ICIs. A combinação dos resultados de vários estudos clínicos que incidam nesta temática com achados recentes na área da Biologia Molecular permitirá estratificar os doentes de acordo com a sua sensibilidade aos ICIs, tendo por base o nível de expressão de PD-L1 e as mutações presentes. (11)

De acrescentar que, a ocorrência simultânea de algumas mutações que parece aumentar significativamente a resposta dos pacientes com CPNPC aos ICIs, serve de prova de que o princípio da estratificação dos doentes é substancialmente mais informativo para guiar cada decisão clínica. (16)

É evidente que cada biomarcador mencionado na presente monografia apresenta os seus pontos fortes e fracos, pelo que uma combinação de múltiplos biomarcadores que inclui múltiplas variáveis e não apenas um único fator biológico, constituindo uma espécie de “imunograma”, poderá ser a melhor alternativa para prever a eficácia dos ICIs ou o risco de adquirir resistência à terapêutica, em doentes com CPNPC. (7,9)

Em suma, apesar da vasta investigação existente na área e identificação de biomarcadores que possam vir a ser muito úteis na gestão clínica de cada doente com CPNPC, ainda existe um longo percurso a percorrer e é premente a realização de estudos prospetivos que validem a utilidade destes componentes e contribuam para a standardização do seu uso na prática clínica.



## Referências Bibliográficas

1. Jameson, J. Larry; Loscalzo, Joseph; Longo, Dan; Kasper, Dennis; Hauser, Stephen; Fauci A. Harrison's Principles Of Internal Medicine. MCGRAW-HILL EDUCATION, editor. 2022.
2. Schafer, Andrew I.; Goldman L. Goldman-Cecil Medicine. Elsevier - Health Sciences Division, editor. 2944 p.
3. Direção-Geral da Saúde. Norma nº 032/2013. Diagnóstico e Tratamento do Carcinoma de Não Pequenas Células do Pulmão. 2013.
4. Zhu M, Zhang L, Cui H, Zhao Q, Wang H, Zhai B, et al. Co-Mutation of FAT3 and LRP1B in Lung Adenocarcinoma Defines a Unique Subset Correlated With the Efficacy of Immunotherapy. *Front Immunol.* 2022 Jan;12(January):800951.
5. Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional Para As Doenças Oncológicas 2019. Desafios e Estratégias. Lisboa; 2019.
6. Travis WD, Brambilla E, HK M-H, Harris CC E. Pathology & Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC/Press. 2004;344.
7. Bravaccini S, Bronte G, Ulivi P. Tmb in nsclc: A broken dream? *Int J Mol Sci.* 2021;22(12).
8. Meng G, Liu X, Ma T, Lv D, Sun G. Predictive value of tumor mutational burden for immunotherapy in non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One [Internet].* 2022;17(2 February).
9. Nan Z, Guoqing W, Xiaoxu Y, Yin M, Xin H, Xue L, et al. The Predictive Efficacy of Tumor Mutation Burden (TMB) on Nonsmall Cell Lung Cancer Treated by Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2021;2021.
10. Jöhrens K, Rüschoff J. The challenge to the pathologist of PD-L1 expression in tumor cells of non-small-cell lung cancer—an overview. *Curr Oncol.* 2021 Dec;28(6):5227–39.
11. Tanaka I, Morise M. Current immunotherapeutic strategies targeting the PD-1/PD-L1 axis in non-small cell lung cancer with oncogenic driver mutations. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec;23(1):1–15.
12. De Giglio A, Di Federico A, Nuvola G, Deiana C, Gelsomino F. The Landscape of Immunotherapy in Advanced NSCLC: Driving Beyond PD-1/PD-L1 Inhibitors (CTLA-4, LAG3, IDO, OX40, TIGIT, Vaccines) [Internet]. *Curr Oncol Rep.* 2021 Aug;23(11):126.
13. Remon J, Facchinetti F, Besse B. The efficacy of immune checkpoint inhibitors in thoracic malignancies [Internet]. *Eur Respir Rev.* 2021 Oct;30(162):200387.

14. Khwaja RM, Chu QS. Present and Emerging Biomarkers in Immunotherapy for Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: A Review. *Curr Oncol*. 2022 Jan;29(2):479–89.
15. Wei X, Gu L, Heng W. T lymphocytes related biomarkers for predicting immunotherapy efficacy in non-small cell lung cancer [Review]. *Oncol Lett*. 2021 Feb;21(2):89.
16. Addeo A, Passaro A, Malapelle U, Luigi Banna G, Subbiah V, Friedlaender A. Immunotherapy in non-small cell lung cancer harbouring driver mutations [Internet]. *Cancer Treat Rev*. 2021 May;96:102179.
17. Feng Z, Yin Y, Liu B, Zheng Y, Shi D, Zhang H, et al. Prognostic and Immunological Role of FAT Family Genes in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Contr*. 2022 Jan-Dec;29:1–0732748221076682.
18. Zhang W, Shi F, Kong Y, Li Y, Sheng C, Wang S, et al. Association of PTPRT mutations with immune checkpoint inhibitors response and outcome in melanoma and non-small cell lung cancer. *Cancer Med*. 2022 Feb;11(3):676–91.
19. Sun L, Li M, Deng L, Niu Y, Tang Y, Wang Y, et al. MGA Mutation as a Novel Biomarker for Immune Checkpoint Therapies in Non-Squamous Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Pharmacol*. 2021 Apr;12(April):625593.
20. Genova C, Dellepiane C, Carrega P, Sommariva S, Ferlazzo G, Pronzato P, et al. Therapeutic Implications of Tumor Microenvironment in Lung Cancer: Focus on Immune Checkpoint Blockade. *Front Immunol*. 2022 Jan;12(January):799455.
21. Kang DH, Chung C, Sun P, Lee DH, Lee SI, Park D, et al. Circulating regulatory T cells predict efficacy and atypical responses in lung cancer patients treated with PD-1/PD-L1 inhibitors [Internet]. *Cancer Immunol Immunother*. 2022 Mar;71(3):579–88.
22. Duchemann B, Naigeon M, Auclin E, Ferrara R, Cassard L, Jouniaux JM, et al. CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> to CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> ratio (PERLS) is associated with prognosis of patients with advanced NSCLC treated with PD-(L)1 blockers. *J Immunother Cancer*. 2022 Feb;10(2):1–12.
23. Zhao Q, Bi Y, Sun H, Xiao M. Serum IL-5 and IFN- $\gamma$  Are Novel Predictive Biomarkers for Anti-PD-1 Treatment in NSCLC and GC Patients. *Dis Markers*. 2021 Jun;2021:5526885.
24. Park CK, Oh HJ, Kim MS, Koh BG, Cho HJ, Kim YC, et al. Comprehensive analysis of blood-based biomarkers for predicting immunotherapy benefits in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2021 May;10(5):2103–17.

25. Klümper N, Saal J, Berner F, Lichtensteiger C, Wyss N, Heine A, et al. C reactive protein flare predicts response to checkpoint inhibitor treatment in non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer*. 2022 Mar;10(3):e004024.
26. Takada K, Takamori S, Shimokawa M, Toyokawa G, Shimamatsu S, Hirai F, et al. Assessment of the albumin-bilirubin grade as a prognostic factor in patients with non-small-cell lung cancer receiving anti-PD-1-based therapy [Internet]. *ESMO Open*. 2022 Feb;7(1):100348.
27. Di Noia V, D'Argento E, Pilotto S, Vita E, Ferrara MG, Damiano P, et al. Blood serum amyloid A as potential biomarker of pembrolizumab efficacy for patients affected by advanced non-small cell lung cancer overexpressing PD-L1: results of the exploratory "FoRECATT" study [Internet]. *Cancer Immunol Immunother*. 2021 Jun;70(6):1583–92.
28. Thompson NA, Stewart GD, Welsh SJ, Doherty GJ, Robinson MJ, Neville BA, et al. The MITRE trial protocol: a study to evaluate the microbiome as a biomarker of efficacy and toxicity in cancer patients receiving immune checkpoint inhibitor therapy [Internet]. *BMC Cancer*. 2022 Jan;22(1):99.
29. Zhang F, Ferrero M, Dong N, D'Auria G, Reyes-Prieto M, Herreros-Pomares A, et al. Analysis of the gut microbiota: an emerging source of biomarkers for immune checkpoint blockade therapy in non-small cell lung cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 May;13(11):2514.
30. Zhang C, Wang J, Sun Z, Cao Y, Mu Z, Ji X. Commensal microbiota contributes to predicting the response to immune checkpoint inhibitors in non-small-cell lung cancer patients. *Cancer Sci*. 2021 Aug;112(8):3005–17.

