



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA  
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

DANIELA FILIPA ALMEIDA BENTO

***Monitorização Imunológica da Terapia com Inibidores dos  
Checkpoints Imunológicos em pacientes com Cancro do  
Pulmão***

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE PNEUMOLOGIA

Trabalho realizado sob orientação de:

DRA. ANA MARIA FERREIRA RODRIGUES FIGUEIREDO  
DR. PAULO JORGE FERREIRA RODRIGUES DOS SANTOS

ABRIL/2018

**MONITORIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DA TERAPIA COM INIBIDORES DE  
CHECKPOINTS IMUNOLÓGICOS EM PACIENTES COM CANCRO DO  
PULMÃO**

**MONITORING IMMUNODYNAMICS IN IMMUNE CHECKPOINT  
INHIBITOR THERAPY IN PATIENTS WITH LUNG CANCER**

**D. Bento<sup>1\*</sup>, J. S. Almeida<sup>2,3</sup>, P. Couceiro<sup>2,3</sup>, V. Alves<sup>3,4</sup>, M. Santos-Rosa<sup>3,4</sup>, F. J. Barata<sup>5</sup>, P.  
Rodrigues-Santos<sup>2,3,4</sup>, A. Figueiredo<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra (Portugal)

<sup>2</sup>Laboratório de Imunologia e Oncologia, Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra (Portugal)

<sup>3</sup>Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra (Portugal)

<sup>4</sup>Instituto de Imunologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra (Portugal)

<sup>5</sup>Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Serviço de Pneumologia B, Coimbra (Portugal)

\*Correio eletrónico: [daniela\\_bento@hotmail.com](mailto:daniela_bento@hotmail.com)

Este trabalho foi submetido para apresentação sob a forma Oral ou Poster nos seguintes congressos

- European Respiratory Society (ERS) International Congress 2018, Paris France, 15-19 September (Anexo 1);
- 3<sup>RD</sup> Associação Portuguesa para a Investigação do Cancro (ASPIC) International Congress, Fundação Calouste Gulbenkian; Lisbon Portugal, 10-11 May 2018 (Anexo 2)

## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	5
RESUMO .....	6
PALAVRAS-CHAVE .....	7
ABSTRACT .....	8
KEYWORDS.....	9
1 - INTRODUÇÃO .....	10
2 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	13
2.1. Desenho do estudo e critérios de inclusão .....	13
2.2. Caracterização dos doentes .....	14
2.3. PD-1, PD-L1 e imunofenotipagem do sangue periférico .....	17
2.4. Análise estatística .....	17
3 – RESULTADOS .....	18
4 – DISCUSSÃO / CONCLUSÃO .....	25
AGRADECIMENTOS.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
ANEXOS.....	38

## **ABREVIATURAS**

CPNPC – Carcinoma do Pulmão de não pequenas células

CTLA-4 - *Cytotoxic T-lymphocyte protein 4*

HLA-DR - Recetor de superfície do Complexo Major de Histocompatibilidade da classe II

### **IMT – Imunoterapia**

MDSCs – *Myeloid derived suppressor cells*

mDC1 – *Myeloid dendritic cells, type 1*

mDC2 – *Myeloid dendritic cells, type 2*

e-MDSCs – *Early-Myeloid derived suppressor cells*

PMN-MDSCs – *Polymorphonuclear-Myeloid derived suppressor cells*

MHC - *Major histocompatibility complex*

M-MDSCs – *Monocytic-Myeloid derived suppressor cells*

NK – *Natural Killer*

PD-1 - *Programmed cell death protein 1*

PD-L1- *Programmed death-ligand 1*

TILs - *Tumour Infiltrating Lymphocytes*

Treg – T reguladoras

## RESUMO

**Introdução:** Atualmente o cancro do pulmão é a principal causa de morte mundial por patologia oncológica e o subtipo de células não pequenas (CPNPC) a forma predominante da doença, sendo fundamental o desenvolvimento de uma terapia que prolongue significativamente a sobrevivência do doente, sem comprometer a qualidade de vida. Nesse sentido, nos últimos anos a imunoterapia com o recurso a inibidores de *checkpoints* imunológicos tornou-se numa área primária de interesse clínico no tratamento do CPNPC.

**Objetivos:** Avaliar o estado imunológico de 15 doentes com CPNPC em estadio IIIB/IV, candidatos ou já a efetuar terapêutica com inibidores de *checkpoint* imunológicos, anti-PD-1/PDL-1, de forma a obter elações sobre os efeitos da imunoterapia no tratamento do CPNPC e estabelecer parâmetros preditores de resposta clínica à terapêutica.

**Métodos:** Foram colhidas amostras de sangue periférico de 3 grupos de doentes com CPNPC: 5 doentes à data do diagnóstico (DX), 5 que finalizaram o tratamento com quimioterapia e são candidatos a imunoterapia (QT) e 5 em tratamento com imunoterapia (IMT). Como grupo controlo, foram estudadas amostras de 39 indivíduos saudáveis, dadores voluntários. Seguidamente foi efetuada uma avaliação laboratorial do estado imunológico através de citometria de fluxo, recorrendo a diversos parâmetros de monitorização.

**Resultados:** A descoberta mais importante consiste no aumento significativo de células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs) em todos os doentes com CPNPC face ao grupo controlo, particularmente MDSC monocíticas (M-MDSC). As células dendríticas mieloides tipo 2 (mDC2) demonstraram os mesmos resultados para pacientes IMT. Relativamente às células T, verificou-se no grupo QT um aumento significativo na subpopulação T CD4, T CD4 HLA-DR+ e Tregs. Quanto aos leucócitos, verificou-se um aumento estatisticamente significativo dos granulócitos para o grupo DX, e um aumento de monócitos nos grupos DX e QT.

Em todos os doentes com CPNPC, verificou-se uma diminuição significativa na proporção de células efectoras:supressoras (E:S), considerando células T CD8 e células NK como efectoras e MDSCs e Tregs como supressoras. Nos doentes IMT, verificou-se uma diminuição significativa nas células que expressam PD-1 e, em alguns casos, a diminuição da densidade de PD-1 foi observada em células T CD4, T CD8, Treg, células B e células NK. Relativamente ao PD-L1, verificou-se uma diminuição da sua expressão nos monócitos no grupo QT.

**Conclusão:** As alterações encontradas nos subconjuntos analisados em doentes IMT com CPNPC, poderão ser importantes para avaliar a resposta à imunoterapia na prática clínica. No entanto, serão necessários estudos adicionais para validar os dados.

## **PALAVRAS-CHAVE**

Carcinoma do pulmão de não pequenas células; Sistema Imunológico; Imunoterapia; Biomarcadores; Checkpoints imunológicos

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Nowadays lung cancer is the main oncology cause of death over the world and non-small cell subtype (NSCLC) is the predominant form of the disease, so the development of a therapy that significantly prolongs the patient's survival is essential, without compromising the quality of life. In the last years, immunotherapy with the use of immune checkpoint inhibitors has become a primary area of clinical interest in the treatment of NSCLC.

**Objectives:** To evaluate the immunological status of 15 patients with stage IIIB/IV NSCLC, candidates or already undergoing therapy with immune checkpoints inhibitors, anti-PD-1/PDL-1, in order to elicit the effects of immunotherapy in the treatment of NSCLC and to establish predictive parameters of response to therapy.

**Methods:** Peripheral blood samples were collected from 3 groups of NSCLC patients: 5 patients at the time of diagnosis (DX), 5 patients who completed chemotherapy and are candidates for immunotherapy (QT) and 5 patients undergoing immunotherapy (IMT). As group control, samples from 39 healthy persons, volunteer donors, were used. A laboratory evaluation of the immunological status was performed through flow cytometry, using several monitoring parameters.

**Results:** The most important finding consists in myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) significant increase in all NSCLC patients compared to control, particularly monocytic MDSC (M-MDSC). Similarly, type 2 myeloid dendritic cells (mDC2) demonstrated the same results for IMT patients. Particular T cells subsets, T CD4, T CD4 HLA-DR+ and Tregs were found significantly increased in QT patients. Relatively to leukocytes, there was a statistically significant increase of granulocytes in DX patients, and an increase of monocytes in DX and QT patients.



In all NSCLC patients, there was a significant decrease in the ratios of effector: suppressor cells (*E:S ratio*), considering CD8 T cells and NK cells as effectors and MDSCs and Tregs as suppressors. In IMT NSCLC patients, a significant decrease in PD-1-expressing cells and in some cases, decrease of density of PD-1 was observed for T CD4, T CD8, Treg cells, B and NK cells. Regarding to PD-L1, there was a decrease in its expression in monocytes in QT patients.

**Conclusion:** Alterations found in the analysed subsets in IMT NSCLC patients could be important to evaluate the immunotherapy response in clinical practice. Further studies are necessary to validate data.

## **KEYWORDS**

Non-small cell lung cancer; Immune System; Immunotherapy; Biomarkers; Immune checkpoint

## 1 - INTRODUÇÃO

O cancro do pulmão, considerada uma doença rara antes de 1900, é atualmente a segunda causa de morte a nível mundial, imediatamente a seguir à patologia cardíaca, e a primeira causa de morte por neoplasia<sup>1,2</sup>, superando assim, o carcinoma da próstata e colorretal no homem, e da mama na mulher. Cerca de 85% destes tumores são do tipo não pequenas células (CPNPC),<sup>3,4</sup> e destes 55% são adenocarcinomas e 34% carcinomas epidermoides, sendo a grande maioria dos casos diagnosticados já em fase sintomática e estadio localmente avançado (70%)<sup>2</sup> ou em fase metastática.

A quimioterapia baseada em dupletos contendo platina contínua, na grande maioria dos casos, como tratamento de primeira linha,<sup>1,5</sup> e apesar de prolongar a sobrevivência e de melhorar a qualidade de vida, os benefícios de curta duração (taxa de sobrevivência aos 5 anos de 52%, 24% e 4%, na doença localizada, regional ou metastática) e a toxicidade inerente constituem as principais limitações.<sup>3</sup>

No início do século XXI surgiram as terapêuticas alvo, dirigidas às mutações *driver*, com taxas de resposta nunca antes atingidas<sup>6,7</sup> e muito baixa toxicidade, mas passíveis de serem utilizadas apenas numa pequena percentagem de doentes e por um tempo limitado, uma vez que todos os doentes acabam por desenvolver resistência aos tratamentos.<sup>8,9</sup>

Mais recentemente, com base em estudos de reconhecimento do papel do sistema imunitário no controlo do desenvolvimento e progressão do cancro<sup>3</sup>, a Imunoterapia (IMT) veio-se juntar à Cirurgia, à Radioterapia, à Quimioterapia e às Terapêuticas alvo como o quinto pilar de tratamento do cancro. Em vez de se usar uma terapêutica dirigida contra o tumor, estimula-se o sistema imune do doente a reconhecer o tumor como *non-self* e a combater a doença.

Entre as abordagens mais promissoras encontram-se as terapêuticas imunomoduladoras, usando anticorpos monoclonais para inibir os *checkpoints* imunológicos (anti-CTLA-4/PD-1/PD-L1) que freiam a resposta imunitária, restaurando assim a resposta imune das células T às células tumorais. Estas terapêuticas revelaram respostas clinicamente significativas e prolongadas,<sup>1</sup> baixa toxicidade e potencial para “memória” e “remissão”, em vários tipos de cancro, inclusivamente o CPNPC. Atualmente, encontram-se aprovados para o tratamento do CPNPC o Nivolumab (anti-PD-1, OPDIVO®, Bristol-Myers Squibb, utilizado em 2ª linha), o Pembrolizumab (anti-PD-1, KEYTRUDA®, Merck, utilizado em 2ª linha nos tumores com expressão de PD-L1 positiva, e em 1ª linha com expressão superior a 50%),<sup>1,3</sup> e o Atezolizumab (anti-PD-L1, TECENTRIQ®, Genentech, usado em 2ª linha).<sup>3,10</sup>

Este tipo de terapêutica apresenta no entanto ainda algumas limitações,<sup>11</sup> com apenas 20 a 30% dos doentes a exibirem resposta significativa e prolongada.<sup>1</sup> É necessário não só perceber melhor os mecanismos imunológicos envolvidos, tendo sempre em mente que a resposta do sistema imune é complexa e dinâmica, mas também descobrir fatores preditivos que nos indiquem quais os doentes que poderão vir a ter um benefício clínico prolongado.

A expressão de PD-L1 nas células tumorais ou imunes é, até à data, o único biomarcador capaz de orientar a escolha da terapêutica<sup>3,12</sup> ainda que apresente algumas limitações, uma vez que nem todos os tumores que expressam PD-L1 respondem ao tratamento com inibidores dos *checkpoints*, e existam tumores sem expressão que respondem. É por conseguinte necessário definir outros biomarcadores preditivos de resposta.<sup>10,11</sup>

Mais recentemente os dados de ensaios clínicos parecem mostrar que a avaliação da carga mutacional do tumor (mutações potencialmente geradoras de neoantígenos capazes de estimular o sistema imune) poderá vir a ser usada como preditora de resposta às terapêuticas imunes.<sup>13,14,15,16</sup>

Mas para que haja uma resposta imune, não só o tumor tem que ser imunogênico e não haver inibição da resposta dos linfócitos T através da estimulação dos *checkpoints* imunitários, como também tem que haver uma chamada de células efetoras e a sua penetração no tumor. Foram assim definidos três fenótipos imunológicos: o Tumor Inflamado <sup>10</sup>, o Tumor Imuno-excluído e o Deserto Imunológico. <sup>17</sup> O fenótipo do tumor inflamado caracteriza-se pela infiltração do parênquima tumoral por células T CD4 e/ou T CD8 (TILs: *Tumour Infiltrating Lymphocytes*), muitas vezes acompanhadas por células efetoras mielóides e monocíticas, células *natural killer* (NK) <sup>10</sup> e citocinas pró-inflamatórias favoráveis à ativação e expansão de células T. Verificou-se que as respostas clínicas à IMT ocorrem mais frequentemente em doentes com este perfil imunológico. <sup>12,17</sup> O fenótipo do tumor imuno-excluído também é caracterizado pela presença de células imunológicas a nível do estroma que sofrem ativação e proliferação, mas que no entanto não penetram no parênquima tumoral, pelo que raramente existe resposta à IMT. <sup>12,17</sup> O deserto imunológico é caracterizado pela escassa presença ou ausência de células T no parênquima e estroma tumoral, apresentando estes tumores muito raramente resposta à terapêutica imunológica com anti-PD-L1/PD-1. <sup>12,17</sup>

Para além do estudo mais específico do tumor e do ambiente tumoral, a avaliação genérica do estado imunológico do doente, através da contagem no sangue periférico de linfócitos e de outras células implicadas na resposta imunitária, pode-nos dar informações preciosas e fáceis de obter. Vários estudos em doentes com melanoma tratados com inibidores dos *checkpoints* parecem já demonstrar correlação entre variações no número de eosinófilos com a resposta à imunoterapia e com o risco de toxicidade e morte. <sup>10,18,19,20,21</sup> Estudos no melanoma, mas também em doentes com CPNPC têm avaliado a relação neutrófilos:linfócitos (N:L) no pré-tratamento como preditor de resposta. São no entanto estudos retrospectivos e com um pequeno número de doentes. <sup>22,23,24,25,26,27</sup>

Da mesma forma, o estudo dos linfócitos T periféricos parece ser promissor para avaliação da resposta à imunoterapia. Embora a maioria dos estudos tenha sido feita em doentes com melanoma, neoplasia tratada há mais tempo com IMT, existem já alguns estudos pequenos realizados em doentes com CPNPC.<sup>28</sup>

A facilidade de acesso a amostras de sangue periférico tornam esta estratégia de uma enorme utilidade e com um papel de relevo no estudo de doentes submetidos a IMT, e permite alcançar conhecimentos complementares e adicionais para fins prognósticos ou preditivos mais válidos, sendo uma área crescente de estudo.<sup>10</sup>

Propomo-nos neste estudo piloto prospetivo avaliar o estado imunológico de doentes com CPNPC em estadio IIIB/IV, candidatos ou a efetuar terapêutica com inibidores de *checkpoints* imunitários, de forma a tentar estabelecer no futuro parâmetros adicionais preditores de resposta a estas novas terapêuticas.

## **2 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Desenho do estudo e critérios de inclusão**

Foi realizado um estudo piloto unicêntrico, prospetivo observacional.

Para o estudo foram selecionados 15 doentes com CPNPC em estadio IIIB/IV: 5 doentes à data do diagnóstico, *naïve* de qualquer terapêutica (Grupo DX); 5 doentes que finalizaram o tratamento com quimioterapia e são candidatos a imunoterapia (Grupo QT); e 5 doentes em tratamento com imunoterapia (Grupo IMT). Estes doentes foram recrutados de forma sequencial na consulta de Pneumologia Oncológica do Serviço de Pneumologia B do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (Diretor: Dr. Fernando Barata), de Dezembro de 2017 a Março de 2018. A todos foi explicado o estudo e após aceitarem participar assinaram o consentimento informado. Levaram cópia (Anexo 3).

Como grupo controlo, foram estudadas amostras de indivíduos saudáveis, num total de 39 dadores voluntários para o estudo, profissionais do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, com uma idade média de 66 anos (dp=17, variação=43-87), sendo maioritariamente mulheres (61,54%).

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética (nº do processo: CHUC-073-17) e pela Comissão Nacional de Proteção de Dados (nº do processo: 17408/2017).

## **2.2. Caraterização dos doentes**

A amostra foi constituída por um total de 15 doentes com CPNPC, com uma idade média de 66,2 anos (dp=7,78, variação=39-84), maioritariamente homens (73,33%). Destes, 9 doentes apresentam CPNPC do tipo histológico adenocarcinoma, dentro dos quais 8 em estadio IV e 1 em estadio IIIB. Os restantes 6 doentes apresentam CPNPC do tipo epidermóide, dos quais 3 em estadio IV e 3 em estadio IIIB.

Os dados detalhados referentes a cada um dos 3 grupos encontram-se descritos na Tabela 1.

**TABELA 1: Características dos três grupos de doentes com cancro do pulmão de não pequenas células incluídos no estudo**

Variável	DX N=5	QT N=5	IMT N=5
<b>Idade (anos)</b>			
<b>M (dp); variação</b>	64,4 (17,01); 39-84	71,8 (3,56); 69-78	62,4 (9,10); 51-73
≤65 (N, %)	2 (40%)	0 (0%)	2 (40%)
>65	3 (60%)	5 (100%)	3 (40%)
<b>Género (N,%)</b>			
Homens	4 (80%)	3 (60%)	4 (80%)
Mulheres	1 (20%)	2 (40%)	1 (20%)
<b>Tipo Histológico (N,%)</b>			
Adenocarcinoma	3 (60%)	3 (60%)	3 (60%)
Epidermoide	2 (40%)	2 (40%)	2 (40%)
<b>Estadio (N,%)</b>			
IIIB	0 (0%)	3 (60%)	2 (40%)
IV	5 (100%)	2 (40%)	3 (60%)
<b>PD-L1 (N,%)</b>			
Positivo	0 (0%)	2 (40%)	3 (60%)
Negativo	5 (100%)	3 (60%)	2 (40%)
<b>EGFR (N)</b>			
Positivo	0	0	0
Negativo	2	2	4
<b>ALK (N)</b>			
Positivo	0	0	1
Negativo	2	1	2
<b>ROS 1 (N)</b>			
Positivo	0	0	0
Negativo	2	1	2
<b>Hábitos Tabágicos (N,%)</b>			
Fumador	1 (20%)	1 (20%)	2 (40%)
Ex-Fumador	3 (60%)	3 (60%)	1 (20%)
Não Fumador	1 (20%)	1 (20%)	2 (40%)
<b>Alterações Hematológicas (N,%)</b>			
Sim	5 (100%)	4 (80%)	4 (80%)
Não	0 (0%)	1 (20%)	1 (20%)
<b>Performance Status à data da colheita (N,%)</b>			
0	1 (20%)	2 (40%)	0 (0%)
1	4 (80%)	3 (60%)	5 (100%)

*N= total de elementos; M= média; dp= desvio padrão; PD-L1= Programmed death-ligand 1; EGFR= Epidermal growth factor receptor; ALK= Anaplastic lymphoma kinase; ROS 1= Proto-oncogene tyrosine-protein kinase*

Na Tabela 2, encontram-se discriminados os tratamentos prévios à IMT e sua resposta, assim como, o fármaco usado na IMT, efeitos adversos e resposta desta terapêutica à data da colheita.

**TABELA 2: Características do tratamento prévio e atual, efeitos adversos e respetiva resposta, referente ao grupo IMT de doentes com cancro do Pulmão incluídos neste estudo.**

<i>Doente</i>	<i>PD-L1</i>	<i>Tratamento prévio / Resposta</i>	<i>IMT / Efeitos adversos / Resposta</i>
IMT#1	-	Carboplatina + Vinorelbina: RP Docetaxel: EST	<b>Nivolumab</b> , 7 ciclos até à data da colheita EA: queixas de limitação funcional dos membros superiores EST
IMT#2	+	Carboplatina + Pemetrexed: EST	<b>Pembrolizumab</b> , 9 ciclos até à data da colheita EA: Astenia; ligeira elevação das enzimas hepáticas RP
IMT#3	-	Cisplatina + Vinorelbina + RT: RP Carboplatina + Pemetrexed: RP Radiocirurgia cerebral	<b>Nivolumab</b> , 6 ciclos até data da colheita EA: Tonturas, astenia, mialgias, aumento ponderal; agravamento de quisto mamário com sinais inflamatórios EST
IMT#4	-	Cisplatina + Vinorelbina + RT sequencial: EST Crizotinib: P Carboplatina + Pemetrexed: P Docetaxel: P	<b>Nivolumab</b> , 10 ciclos até à data da colheita EA: Dores articulares EST
IMT#5	+	Cisplatina + Pemetrexed: RP	<b>Pembrolizumab</b> , 11 ciclos até à data da colheita EA: Tonturas; lacrimejo e visão turva; artralgias RP

EA = Efeitos adversos; EST = Estabilidade; P = Progressão; RP = Resposta parcial



### **2.3. PD-1, PD-L1 e imunofenotipagem do sangue periférico**

Numa primeira abordagem foram colhidas amostras de sangue periférico em tubos com EDTA. Os doentes foram sujeitos unicamente a uma colheita, efectuada aquando de outras colheitas de rotina da prática clínica normal.

Usando o contador hematológico (Coulter A<sup>°</sup>T diff, Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA) acedeu-se ao valor absoluto dos leucócitos nas amostras de sangue periférico. Em seguida, misturaram-se 100 uL ou até  $1 \times 10^6$  células com os anticorpos superficiais, e foram incubados durante 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. Após a incubação, procedeu-se à lise dos glóbulos vermelhos através de uma solução (BD Lysing Solution, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) durante 10 minutos. Seguidamente, realizou-se centrifugação das suspensões de células, a 453g durante 5 minutos e uma lavagem com PBS (solução salina tamponada com fosfato), nas mesmas condições. Por fim, as suspensões celulares foram analisadas com um citómetro de fluxo de 8 cores - BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) com utilização do software BD FACSDiva<sup>™</sup> v.6.1.3 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Os anticorpos utilizados são descritos na Tabela S1 (Anexo 4). Estes anticorpos permitiram discriminar populações major e minor a partir de linfócitos, monócitos e células dendríticas.

No Anexo 5 (Figuras S1-S7) está descrita a estratégia de *gating* utilizada.

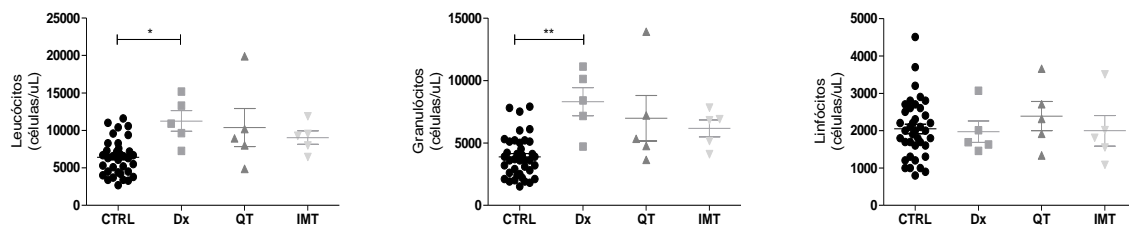
### **2.4. Análise estatística**

A análise estatística seguiu o modelo de Kruskal-Wallis, com o teste de *Dunns* para as comparações múltiplas entre os grupos. As comparações entre dois grupos foram efetuadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Recorreu-se ao programa informático GraphPad Prism v6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

### 3 – RESULTADOS

#### *Granulocitose nos doentes em diagnóstico*

Numa primeira análise, os resultados revelaram um aumento do número absoluto de leucócitos nos 3 grupos de doentes comparativamente ao grupo controlo, com valor estatístico no grupo DX ( $p < 0.05$ ). Este aumento reflete-se essencialmente nos granulócitos, também com valor estatístico para o grupo DX ( $p < 0.01$ ). Relativamente à frequência absoluta dos linfócitos, o mesmo não se verificou (Figura 1).

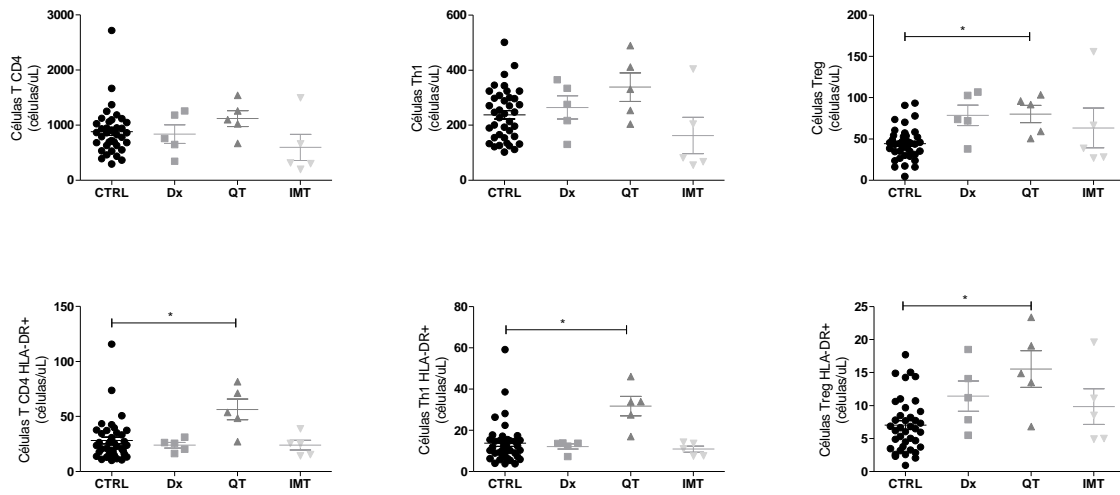


**FIGURA 1.** Frequências absolutas de leucócitos, granulócitos e linfócitos no cancro do pulmão de não pequenas células de grau IIB/IV. Valores obtidos do hemograma de cada doente, grupo de diagnóstico (Dx, n=5), grupo de quimioterapia (QT, n=5), grupo de imunoterapia (IMT, n=5) e grupo controlo (CTRL, n=39). A análise estatística seguiu o modelo de Kruskal-Wallis, com o teste de *Dunns* para as comparações múltiplas entre os grupos;  $p < 0.05$ \*,  $p < 0.01$ \*\*,  $p < 0.001$ \*\*\*.

#### *Ativação das células T na quimioterapia*

Relativamente às células T CD4, T CD8 e suas subpopulações, ao avaliar as frequências absolutas e o estado de ativação através da presença da expressão de HLA-DR (recetor de superfície do Complexo Major de Histocompatibilidade da classe II), constatámos que as maiores alterações se observaram nas populações T CD4. Apesar de não haver significado estatístico para as frequências absolutas das células T CD4 e Th1, ao determinar o estado de ativação, o grupo QT apresentou células significativamente mais ativadas comparativamente ao grupo controlo ( $p < 0.05$ ). De um modo geral, as células T reguladoras (Treg) estão aumentadas nos doentes, face aos controlos, assim como a ativação destas

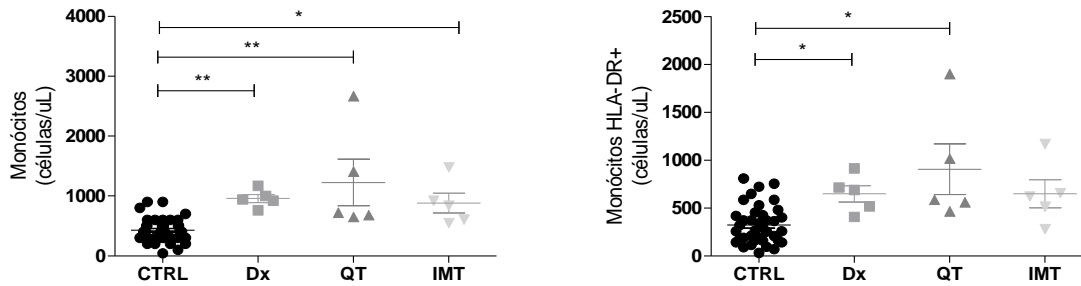
células, com significado estatístico para o grupo QT ( $p<0.05$ ) comparativamente ao grupo controle (Figura 2).



**FIGURA 2. Frequências absolutas de células T CD4, Th1 e Tregs e respetivas populações ativadas (HLA-DR+) no cancro do pulmão de não pequenas células de grau IIB/IV.** Os valores das frequências relativas foram obtidos por citometria de fluxo, sendo depois convertidos nas respetivas frequências absolutas. Grupo de diagnóstico (Dx, n=5), grupo de quimioterapia (QT, n=5), grupo de imunoterapia (IMT, n=5) e grupo controle (CTRL, n=39). A análise estatística seguiu o modelo de Kruskal-Wallis, utilizando o teste de *Dunns* para as comparações múltiplas entre os grupos,  $p<0.05^*$ ,  $p<0.01^{**}$ ,  $p<0.001^{***}$ .

### ***Monocitose e ativação de monócitos no cancro do pulmão***

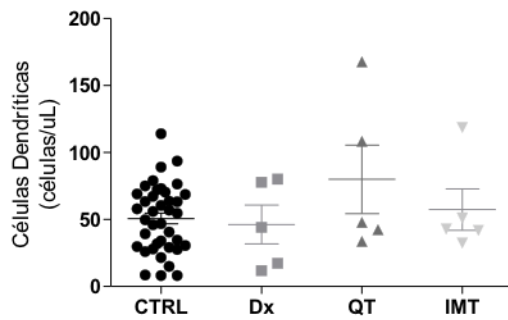
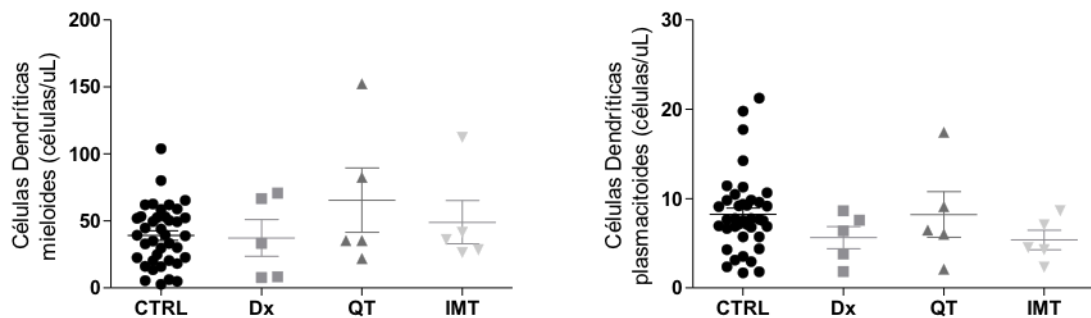
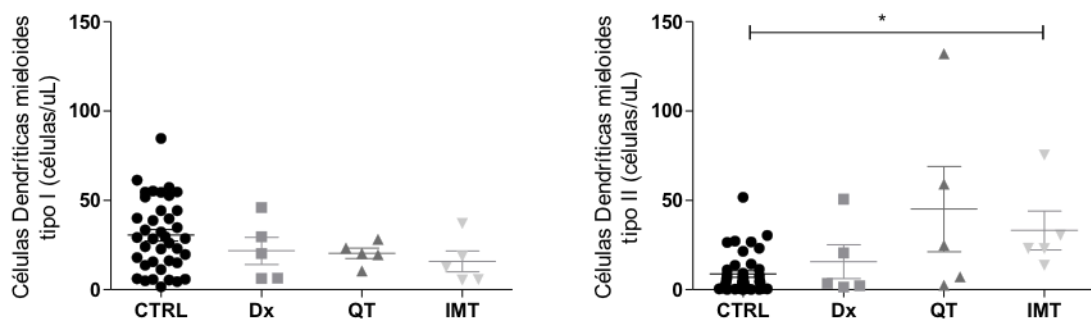
Como referido e explicitado na Figura 1, os leucócitos estão aumentados em todos os doentes. Tal, reflete-se também no aumento dos monócitos em valor absoluto. Este aumento é estatisticamente significativo para todos os grupos, face ao grupo controle, sendo mais acentuado no grupo DX ( $p<0.01$ ) e de QT ( $p<0.01$ ), do que no grupo IMT ( $p<0.05$ ). O estado de ativação destas células, pela presença do HLA-DR, também foi determinado. Observámos que estas células estão, significativamente, mais ativadas nos grupos DX e QT comparativamente ao grupo controle, com valor de  $p<0.05$  para ambos os grupos (Figura 3).



**FIGURA 3. Frequências absolutas de monócitos e de monócitos ativados (HLA-DR+) no cancro do pulmão de não pequenas células de grau IIB/IV.** Os valores referentes aos monócitos foram obtidos do hemograma, enquanto que a frequência absoluta dos monócitos HLA-DR+ foi determinada através dos valores das frequências relativas obtidas por citometria de fluxo. Grupo de diagnóstico (Dx, n=5), grupo de quimioterapia (QT, n=5), grupo de imunoterapia (IMT, n=5) e grupo controlo (CTRL, n=39). A análise estatística seguiu o modelo de Kruskal-Wallis, utilizando o teste de *Dunn's* para as comparações múltiplas entre os grupos,  $p < 0.05$ \*,  $p < 0.01$ \*\* ,  $p < 0.001$ \*\*\*.

### *Expansão de células dendríticas mieloides do tipo II após imunoterapia*

Avaliámos a frequência absoluta das células dendríticas e das suas subpopulações. Relativamente às células dendríticas e suas subpopulações mieloides (mDC) e plasmacitóides (pDC), não observámos alterações comparativamente ao grupo controlo. No entanto, ao avaliar as subpopulações das mDCs, tipo I e tipo II, verificamos que a população mDC do tipo II está aumentada no grupo IMT, com valor estatístico significativo ( $p < 0.05$ ), em comparação com o grupo controlo (Figura 4).

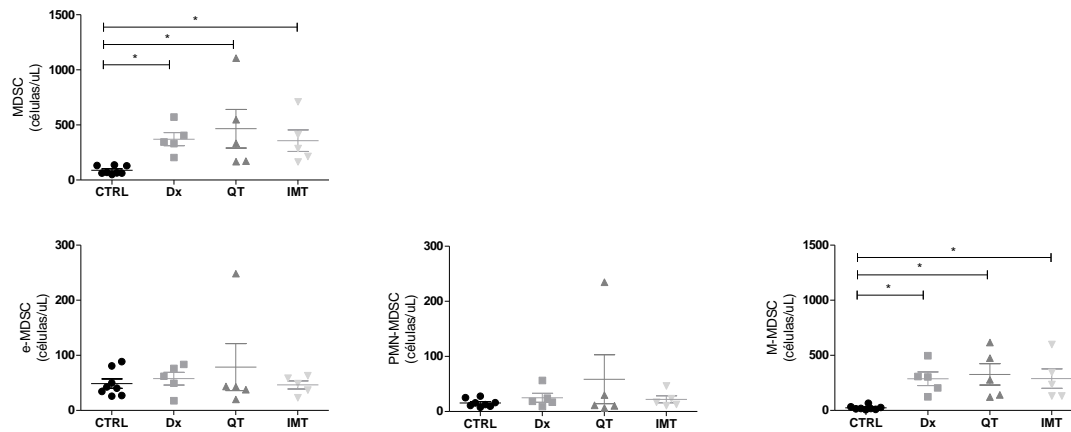
**A****B****C**

**FIGURA 4.** Frequências absolutas de (A) células dendríticas, (B) mielóides e plasmacitóides e (C) mielóides tipo I e tipo II no cancro do pulmão de não pequenas células de grau IIB/IV. Os valores das frequências relativas foram obtidos por citometria de fluxo, sendo depois convertidos nas respetivas frequências absolutas. Grupo de diagnóstico (Dx, n=5), grupo de quimioterapia (QT, n=5), grupo de imunoterapia (IMT, n=5) e grupo controlo (CTRL, n=39). A análise estatística seguiu o modelo de Kruskal-Wallis, utilizando o teste de *Dunns* para as comparações múltiplas entre os grupos,  $p<0.05^*$ ,  $p<0.01^{**}$ ,  $p<0.001^{***}$ .

### *A imunoterapia não reduz a população de MDSC de origem monocítica*

Determinámos a frequência das células supressoras derivadas da linha miéloide (MDSC) nos doentes. Em termos absolutos estas células estão aumentadas em todos os grupos, com valor estatístico significativo ( $p<0.05$ ). Quando nos centrámos nas suas subpopulações, identificámos que o aumento das MDSCs se deve essencialmente ao aumento

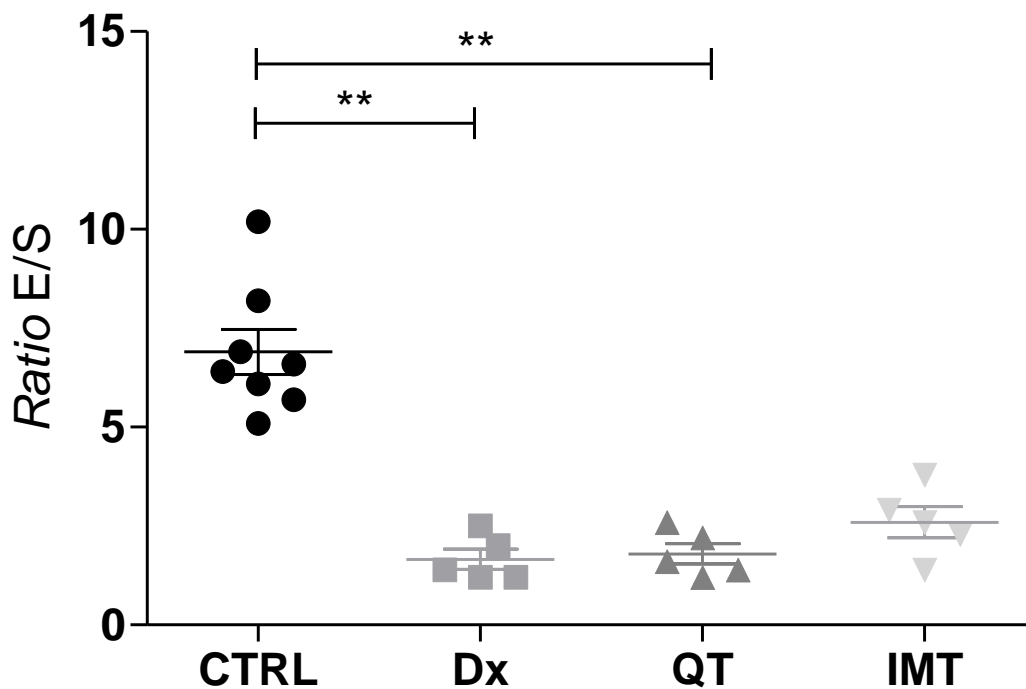
da subpopulação *Monocytic-Myeloid derived suppressor cells* (M-MDSC). Este aumento acontece em todos os grupos de doentes, com um valor de  $p < 0.05$ , em comparação ao grupo controlo (Figura 5).



**FIGURA 5.** Frequências absolutas das células supressoras derivadas da linha mielóide (MDSC) e suas subpopulações *early*-MDSC (e-MDSC), *polymorphonuclear*-MDSC (PMN-MDSC) e *monocytic*-MDSC (M-MDSC) no cancro do pulmão de não pequenas células de grau IIB/IV. Os valores das frequências relativas foram obtidos por citometria de fluxo, sendo depois convertidos nas respetivas frequências absolutas. Grupo de diagnóstico (Dx, n=5), grupo de quimioterapia (QT, n=5), grupo de imunoterapia (IMT, n=5) e grupo controlo (CTRL, n=8). A análise estatística seguiu o modelo de Kruskal-Wallis, com o teste de *Dunns* para as comparações múltiplas entre os grupos,  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.001^{***}$ .

### *Ratio de células efetoras e supressoras no cancro do pulmão*

Determinámos o *ratio* de células efetoras/supressoras (E/S), considerando células NK e T CD8 como células efetoras major, e MDSCs e Tregs como células supressoras. Independentemente do grupo de doentes, observámos que este *ratio* está diminuído quando comparado com os controlos. No entanto, só para o grupo DX e QT os valores foram estatisticamente significativos, com  $p < 0.01$  (Figura 6).



**FIGURA 6. Ratio de células efectoras/supressoras (E/S) no cancro do pulmão de não pequenas células de grau IIB/IV.** As células efectoras são representadas pela soma das frequências absolutas das células T CD8 e NK e as células supressoras representadas pela soma das frequências absolutas das células supressoras derivadas da linha mielóide (MDSC) e das T reguladoras. Os valores das frequências relativas foram obtidos por citometria de fluxo, sendo depois convertidos nas respetivas frequências absolutas. Grupo de diagnóstico (Dx, n=5), grupo de quimioterapia (QT, n=5), grupo de imunoterapia (IMT, n=5) e grupo controlo (CTRL, n=8). A análise estatística seguiu o modelo de Kruskal-Wallis, utilizando o teste de *Dunns* para as comparações múltiplas entre os grupos,  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.001^{***}$ .

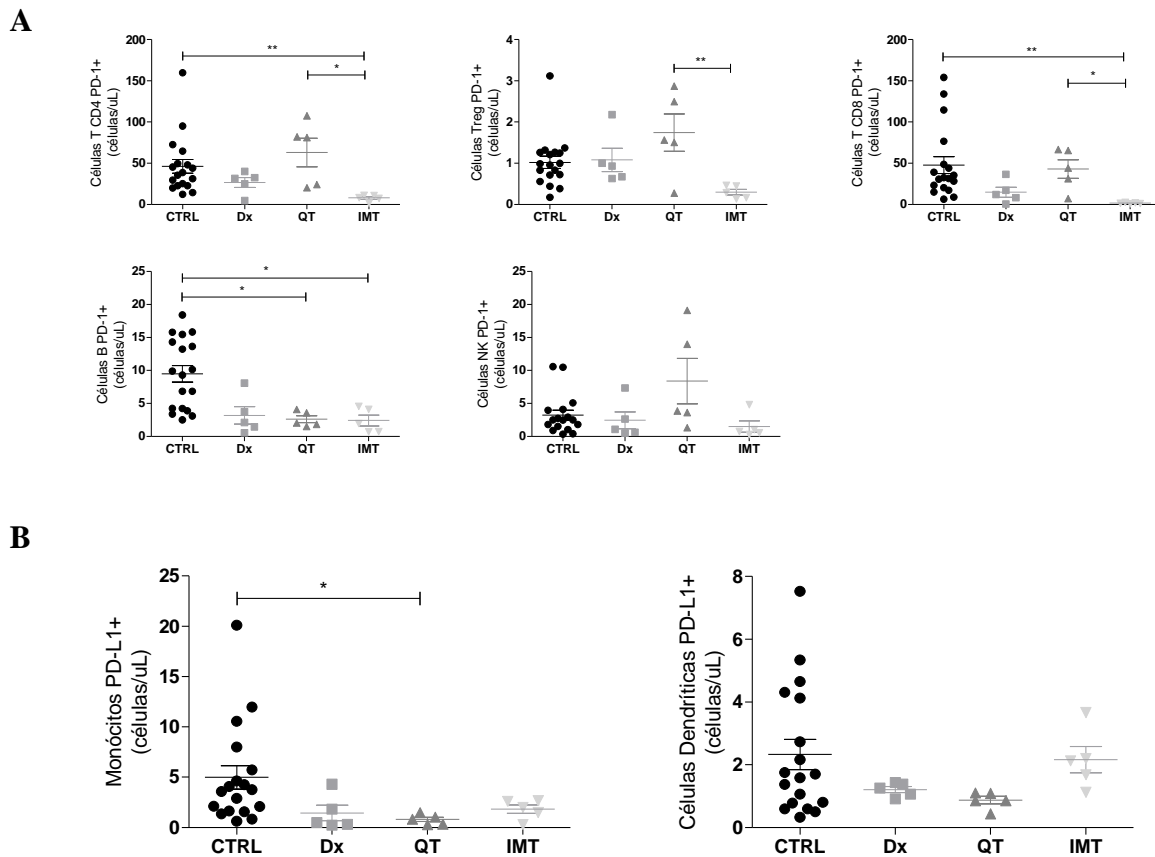
### ***Expressão de PD-1 e PD-L1 nas células do sangue periférico no cancro do pulmão***

Finalmente, determinámos o número absoluto de células a expressar PD-1 e PD-L1.

Relativamente ao PD-1 (Figura 7A), avaliámos a sua expressão para as populações major de linfócitos. Dentro destas, nas células T CD4 e T CD8, verificámos que o grupo IMT tem valores significativamente diminuídos em relação ao grupo controlo ( $p < 0.01$ ) e ao grupo QT ( $p < 0.05$ ). Também as células T reguladoras expressam significativamente menos PD-1 no grupo IMT comparativamente com o grupo QT ( $p < 0.01$ ).

Na população de células B observámos uma diminuição significativa no grupo IMT em relação ao grupo controlo ( $p < 0.05$ ) e ao grupo QT ( $p < 0.05$ ).

Nas células NK, apesar de não ser estatisticamente significativo, constatámos que há uma tendência no grupo IMT para a diminuição da expressão deste receptor, comparativamente ao grupo controlo.



**FIGURA 7. Expressão do recetor PD-1 (A) em linfócitos e do seu ligando PD-L1 (B) em monócitos e células dendríticas no cancro do pulmão de não pequenas células de grau IIB/IV. (A) Frequência absoluta das células T CD4 PD-1, Treg PD-1, T CD8 PD-1, células B PD-1 e células NK PD-1. (B) Frequência absoluta dos monócitos PD-L1 e das células dendríticas PD-L1. Os valores das frequências relativas foram obtidos por citometria de fluxo, sendo depois convertidos nas respetivas frequências absolutas. Grupo de diagnóstico (Dx, n=5), grupo de quimioterapia (QT, n=5), grupo de imunoterapia (IMT, n=5) e grupo controlo (CTRL, n=18). A análise estatística seguiu o modelo de Kruskal-Wallis, utilizando o teste de *Dunns* para as comparações múltiplas entre os grupos,  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.001^{***}$ .**

Relativamente ao PD-L1 (Figura 7B), avaliámos a sua expressão nos monócitos e nas células dendríticas. Para os monócitos, comparativamente com o grupo controlo, observámos uma diminuição estatisticamente significativa no grupo QT ( $p < 0.05$ ) e em relação às células



dendríticas não se verificaram alterações significativas, apesar de parecer haver uma tendência para o aumento da expressão de PD-L1 no grupo IMT.

#### **4 – DISCUSSÃO / CONCLUSÃO**

##### ***O efeito da quimioterapia e da imunoterapia nos granulócitos***

Estudos prévios revelaram que a neutrofilia está associada a um pior prognóstico em vários tipos de cancro tais como, cancro do pulmão, melanoma e cancro renal.<sup>29,30,31</sup> De facto, verificaram uma redução do tempo de recorrência e da sobrevida global em tumores com uma acentuada infiltração de neutrófilos, nomeadamente cancro renal<sup>32</sup>, carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço<sup>33</sup>, adenocarcinoma pancreático<sup>34</sup> e cancro hepático<sup>35</sup>.

A neutrofilia é frequentemente associada a respostas inflamatórias subsequentes a processos infecciosos, inflamatórios, tumorais e danos teciduais evidenciando assim, o conceito de *cancer-related inflammation* e contribuindo para a progressão tumoral.<sup>36</sup>

A granulocitose observada no grupo DX parece ser revertida parcialmente pela QT e IMT. Dado o caráter dual dos granulócitos na erradicação de células tumorais, seria importante efetuar um estudo longitudinal e associar a QT e a IMT, eventualmente a uma resposta favorável.

##### ***Quimioterapia e Linfócitos T CD4***

Sabe-se que os linfócitos T são reconhecidos como os principais efetores de resposta imunológica anti tumoral<sup>37</sup> ao atacar as células tumorais que expressam antígenos tumor-específicos ligados ao complexo major de histocompatibilidade.<sup>38</sup> Estudos prévios demonstraram que a quimioterapia, apesar do seu efeito citotóxico, pode estimular uma resposta imunológica anti tumoral, já que a destruição de células tumorais leva à libertação de

antigénios e o seu reconhecimento leva conseqüentemente ao aumento da ativação de células T e indução de resposta pelas células T CD4 e T CD8. Sabe-se ainda, que a infiltração do estroma tumoral por linfócitos T CD4 estão associados a um melhor prognóstico.<sup>37</sup> Esta percepção sobre os efeitos imunológicos potenciados pela quimioterapia levam a considerar que a combinação desta terapêutica convencional com a IMT pode ter um efeito sinérgico, podendo culminar em melhores resultados clínicos.<sup>39</sup>

No presente estudo, verificou-se uma resposta favorável da quimioterapia com um aumento estatisticamente significativo das células T CD4 face ao grupo controlo.

### ***Impacto dos monócitos no cancro do pulmão***

Relativamente aos monócitos e sua ação no CPNPC, não há ainda consenso. Há estudos que demonstraram que os monócitos tanto são capazes de inibir, como de estimular o crescimento tumoral. Outros, sugeriram que o CPNPC não afeta a adesão de monócitos e a fagocitose, comparativamente aos controlos saudáveis, não afetando portanto a sua expressão.<sup>40</sup>

Neste estudo verificámos um aumento da contagem de monócitos e da sua forma ativada em doentes com CPNPC face aos controlos. Contudo, são necessários mais estudos prospetivos sobre o papel dos monócitos no cancro do pulmão.

### ***Papel da imunoterapia nas células dendríticas mielóides do tipo II***

A diminuição das mDC2 em cancro do pulmão ao diagnóstico foi descrita em estudos de *single cell*.<sup>41</sup> No presente estudo, verificámos que o grupo IMT apresenta um aumento significativo de mDC2 quando comparado com os doentes DX. De facto, estas células têm sido apontadas com interação preferencial para as células T CD8, em contraste com as mDC1

que interagem com as células T CD4.<sup>42,43,44</sup> Contudo, tem sido reportada a indução da proliferação de Th1 e Th17 com produção de citocinas associadas a estes perfis.<sup>45</sup>

Tanto quanto sabemos, não existe na literatura consultada informação sobre o envolvimento das mDCs 2 no cancro do pulmão. Os nossos resultados sugerem que esta pode ser uma população importante para perceber o papel da imunoterapia no CPNPC.

### ***Importância das MDSC monocíticas no cancro do pulmão***

Nos últimos anos, as MDSCs têm sido foco de atenção pelo seu papel nos mecanismos de escape tumoral, pelo seu efeito imunossupressor, pelo contributo para o desenvolvimento e progressão do cancro e por dificultarem a eficácia da quimioterapia e imunoterapia no CPNPC. Estão frequentemente aumentadas neste tipo de tumor,<sup>39</sup> e são indicadoras de mau prognóstico.<sup>46,47</sup>

Estudos anteriores revelaram que a subpopulação predominante em doentes com CPNPC é a M-MDSCs, que se encontra aumentada comparativamente aos controlos, sendo indicador de má resposta à quimioterapia e de menor sobrevivência livre de progressão. Esta subpopulação impede a atividade de células dendríticas e conseqüentemente a resposta imune inata, suprimindo a proliferação e produção de interferão gama (IFN- $\gamma$ ) pelas células T citotóxicas.<sup>46</sup>

A literatura prévia suporta o nosso estudo, tendo-se verificado um aumento de MDSCs em todos os doentes face aos controlos, e mais especificamente das M-MDSCs.

Desta forma, entender o papel das MDSCs na imunossupressão, bem como, conhecer terapêuticas alvo para estas células, isoladamente ou em combinação com terapêuticas de quimioterapia e/ou imunoterapia é fundamental, uma vez que, poderá promover a redução da carga tumoral, inibir o crescimento tumoral, promover a anti-angiogénese e anti-metastização,

aumentar a imunidade anti tumoral (APC, células NK e T), assim como, aumentar a eficácia da quimioterapia e da imunoterapia e consequente controlo mais efetivo do CPNPC.<sup>46</sup>

### ***Proporção de células efectoras e supressoras***

Neste estudo determinámos que o *ratio* E/S, considerando células NK e T CD8 como células efectoras major, e MDSCs e Tregs como células supressoras, se encontrava reduzido em todos os grupos de doentes comparativamente aos controlos, isto é, possivelmente teremos uma diminuição de células efectoras e/ou um aumento de células supressoras da resposta anti tumoral, o que se traduzirá provavelmente numa fraca resposta clínica à terapêutica instituída e uma diminuição da sobrevida. De realçar que o fato de no grupo DX, este *ratio* também estar diminuído pode significar que uma diminuição da vigilância imunológica de base pode ter potenciado o desenvolvimento tumoral. Este estudo mostra não só que poderemos ter marcadores para avaliar as respostas à imunoterapia, mas também, que nos doentes ainda sem qualquer tratamento o perfil imunológico é diferentes do de pessoas saudáveis.

Até ao momento, tanto como sabemos não há ainda estudos conhecidos que tenham relacionado estes grupos celulares em particular, no entanto, estudos prospetivos no melanoma, bem como no CPNPC demonstraram que um *ratio* Neutrófilos/Linfócitos, células supressoras/efectoras, aumentado pré-tratamento é indicativo de mau prognóstico e de falha de resposta clínica ao tratamento instituído, como a quimioterapia ou a imunoterapia.<sup>19,26,48</sup>

### ***Perfil imunológico no cancro do pulmão: impacto da quimioterapia e imunoterapia***

O painel de anticorpos utilizado para avaliar estes doentes permitiu obter as frequências relativas das seguintes populações: leucócitos, granulócitos, monócitos, monócitos HLA-DR+, células dendríticas, células dendríticas mielóides, tipo I e tipo II, e células dendríticas plasmacitoides, MDSC, *early*-MDSC, PMN-MDSC, M-MDSC; células T,

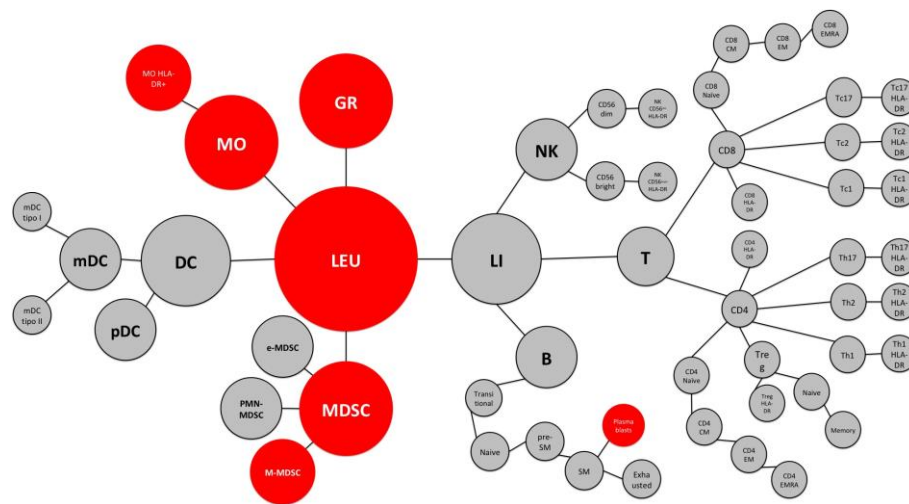
T CD4, Th1, Th17, Th2, T reguladoras e respectivas ativadas (HLA-DR+), T CD8, Tc1, Tc17, Tc2, e respectivas ativadas (HLA-DR+), células B de transição, pré *switch memory*, *switch memory*, *exhausted* e os plasmablastos.

No grupo DX (Figura 8, a vermelho) as células onde se verificaram alterações são os leucócitos, granulócitos, monócitos, monócitos HLA-DR+, MDSCs, M-MDSCs e os plasmablastos, estando todas aumentadas relativamente ao grupo controlo.

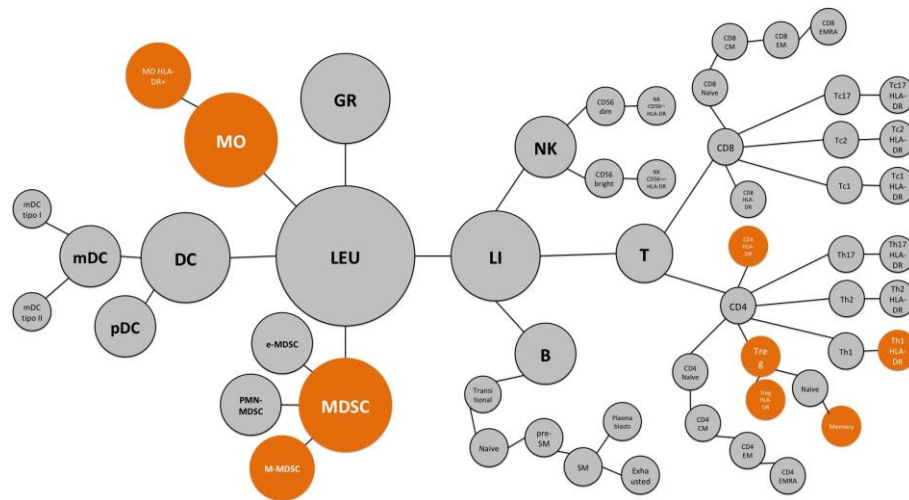
No grupo de QT (Figura 8, a laranja) as células alteradas são os monócitos, monócitos HLA-DR+, MDSCs, M-MDSCs, TCD4 HLA-DR+, Th1, Th1 HLA-DR+, T reguladoras, T reguladoras HLA-DR+, T reguladoras naïve e de memória, estando todas aumentadas relativamente ao grupo controlo.

No grupo IMT (Figura 8, a azul) as células onde se verificaram alterações são os monócitos, monócitos HLA-DR+, MDSCs, M-MDSCs e células dendríticas mielóides do tipo II, estando todas aumentadas relativamente ao grupo controlo.

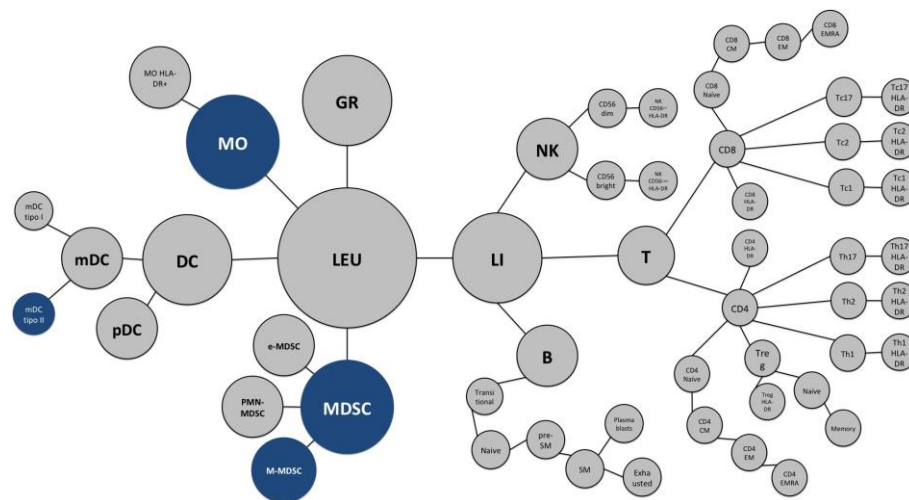
**DX**



**QT**

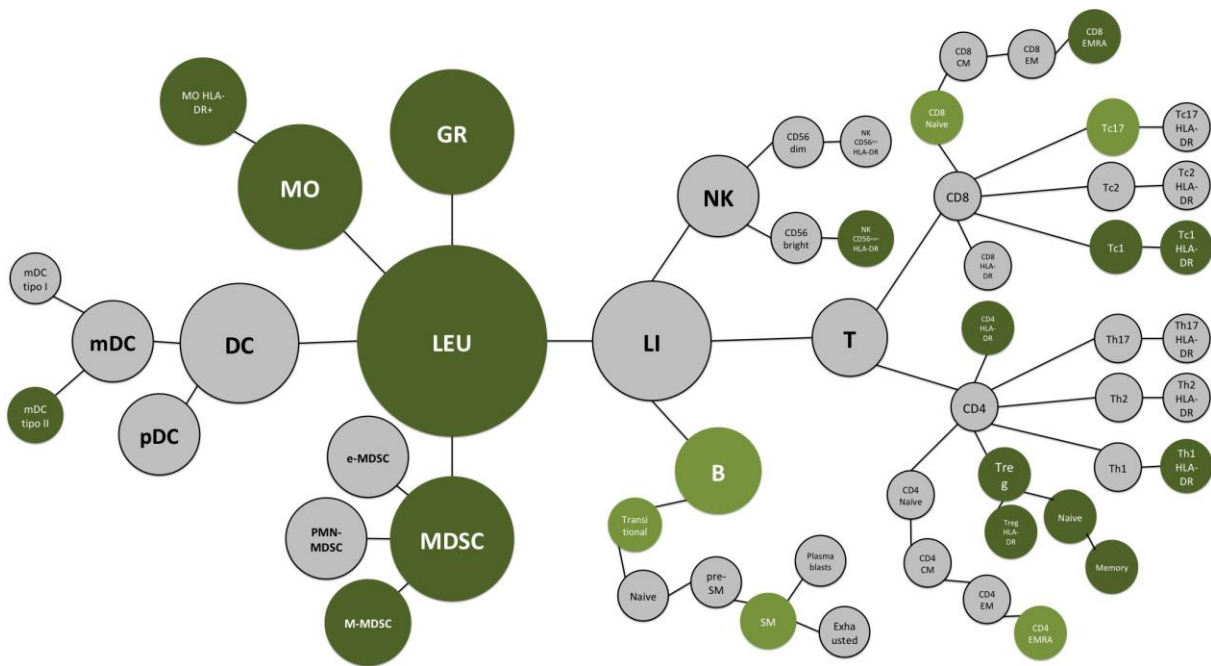


**IMT**



**FIGURA 8.** Representação esquemática das células do sistema imune alteradas no diagnóstico, após quimioterapia e imunoterapia no cancro do pulmão de não pequenas células de grau IIB/IV. As frequências absolutas das células representadas no esquema foram determinadas através das frequências relativas obtidas por citometria de fluxo. As células coloridas representam as populações que estão aumentadas com valor estatisticamente significativo em relação ao grupo controlo. Legenda: Grupo DX, células alteradas a vermelho; Grupo QT, células alteradas a laranja; Grupo IMT, células alteradas a azul.

Comparando todos os doentes com CPNPC com o grupo controlo através da análise estatística (*t-test*), as principais alterações verificadas são relativamente aos granulócitos, monócitos, monócitos HLA-DR+, MDSCs, M-MDSCs, células dendríticas mielóides do tipo II, células T CD4 e sua forma ativada (HLA-DR+), Treg, Th1 HLA-DR+, Tc1 e Tc1 HLA-DR+, as quais estão aumentadas relativamente ao grupo controlo. Contrariamente, as subpopulações de linfócitos B, células de *switch memory* (SM), células B de transição (*transitional*), células T CD4 de memória efetoras (CD4 EMRA), e as subpopulações de células T CD8, naíve e Tc17 estão diminuídas face ao grupo controlo (Figura 9).



**FIGURA 9. Síntese das alterações observadas nas populações celulares do sangue periférico no cancro do pulmão de não pequenas células de grau IIB/IV.** As frequências absolutas das células representadas no esquema foram determinadas através das frequências relativas obtidas por citometria de fluxo. As células coloridas representam as populações que estão aumentadas (cor com maior intensidade) ou diminuídas (cor menos intensidade) com valor estatisticamente significativo em relação ao grupo controlo.

Em suma, é importante perceber como é que as alterações encontradas em amostras de sangue periférico de doentes com CPNPC se correlacionam com o que está a ocorrer a nível intra-tumoral. De facto, se conseguirmos compreender essa relação bem como, estabelecer parâmetros que nos indiquem resposta ou resistência aos tratamentos, poderá ser uma grande mais valia no seguimento de doentes com cancro do pulmão. Importante frisar também, que é um exame exequível em 100% dos doentes, contrariamente às biópsias tumorais que são mais invasivas e por vezes não exequíveis, e mesmo as biópsias líquidas que necessitam de uma carga tumoral grande para se conseguir detetar o ácido desoxirribonucleico (DNA) circulante.

No entanto, estes resultados são ainda precoces, com uma amostra pequena e pouco significativa sendo necessário a realização de mais estudos prospetivos para a sua validação no futuro.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos os participantes pela colaboração neste projeto de investigação.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Ana Figueiredo, pela disponibilidade, apoio, motivação, dedicação e amabilidade.

Agradeço ao meu coorientador, Dr. Paulo Rodrigues Santos, pela disponibilidade, orientação e interesse na elaboração deste trabalho.

Agradeço à Jani Almeida e à Patrícia Couceiro por todo o apoio, paciência, dedicação e disponibilidade prestada.

Agradeço às minhas amigas de curso e colegas de casa, por todo o apoio, paciência, carinho e amizade, por estarem sempre presentes desde o início, e ao longo do percurso na faculdade.

Agradeço às minhas amigas de infância, pela sua presença, apoio, motivação, amizade e força constantes desde sempre.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para tornar estes últimos seis anos mais fáceis.

Agradeço e dedico este trabalho aos meus pais, irmão, avó e família, pelo apoio, incentivo, motivação e por me fazerem acreditar sempre que sou capaz, sem eles não teria sido possível percorrer este caminho!

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jain P, Jain C, Velcheti V. Role of immune-checkpoint inhibitors in lung cancer. *Ther Adv Respir Dis*. 2018;12:1-13. doi: 10.1177/1753465817750075.
2. Domagala-Kulawik J, Raniszewska A. How to evaluate the immune status of lung cancer patients before immunotherapy. *Breathe*. 2017;13:291–296.
3. Gridelli C, Ardizzoni A, Barberis M, Cappuzzo F, Casaluce F, Danesi R, et al. Predictive biomarkers of immunotherapy for non-small cell lung cancer: results from an Experts Panel Meeting of the Italian Association of Thoracic Oncology. *Transl Lung Cancer Res*. 2017;6(3):373–386. doi: 10.21037/tlcr.2017.05.09.
4. Davies M. New modalities of cancer treatment for NSCLC: Focus on immunotherapy. *Cancer Manag Res*. 2014;6(1):63–75.
5. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017;NEJMoA1709937. doi: 10.1056/NEJMoA1709937.
6. Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, Sunpaweravong P, Leong SS, Sriuranpong V, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non - small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol*. 2011;29(21):2866–74.
7. Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, Iafrate AJ, Varella-Garcia M, Fox SB, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: Updated results from a phase I study. *Lancet Oncol*. 2012;13(10):1011–9.
8. Cortot AB, Jänne PA. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *Eur Respir Rev*. 2014;23(133):356–66.
9. Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, Friboulet L, Leshchiner I, Katayama R, et al. Molecular mechanisms of resistance to first- and second-generation ALK inhibitors in ALK - rearranged lung cancer. *Cancer Discov*. 2016;6(10):1118–33.
10. Voong KR, Feliciano J, Becker D, Levy B. Beyond PD-L1 testing-emerging biomarkers for immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Ann Transl Med*. 2017;5(18):376. doi: 10.21037/atm.2017.06.48.
11. Karasaki T, Nagayama K, Kuwano H, Nitadori J ichi, Sato M, Anraku M, et al. An Immunogram for the Cancer-Immunity Cycle: Towards Personalized Immunotherapy of Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2017;12(5):791–803. doi: 10.1016/j.jtho.2017.01.005.
12. Morabito A. Second-line treatment for advanced NSCLC without actionable mutations: is immunotherapy the “panacea” for all patients? *BMC Med*. 2018;16(1):24. Available from: <https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-018-1011-0>.
13. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non – small cell lung cancer. *Science*. 2015;348:124–8.
14. Goodman AM, Kato S, Bazhenova L, Patel SP, Frampton GM, Miller V, et al. Tumor

- Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers. *Mol Cancer Ther.* 2017;8139(847):molcanther.0386.2017. Available from: <http://mct.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1535-7163.MCT-17-0386>
15. Kowanetz M, Zou W, Shames D, Cummings C, Rizvi N, Spira A, et al. Tumor Mutation Burden (TMB) is Associated with Improved Efficacy of Atezolizumab in 1L and 2L+ NSCLC Patients. *J Thorac Oncol.* 2017;12(1):S321–2.
  16. Zarogoulidis P, Papadopoulos V, Maragouli E, Papatsibas G, Sardeli C, Man Y-G, et al. Nivolumab as first-line treatment in non-small cell lung cancer patients-key factors: Tumor mutation burden and PD-L1  $\geq 50\%$ . *Transl Lung Cancer Res.* 2018;7(Suppl 1):28–30.
  17. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature.* 2017;541(7637):321–30.
  18. Blank C, Enk A. Therapeutic use of anti-CTLA-4 antibodies. *Int. Immunol.* 2015;27:310.
  19. Zaragoza J, Caille A, Beneton N, Bens G, Christiann F, Maillard H, et al. High neutrophil to lymphocyte ratio measured before starting ipilimumab treatment is associated with reduced overall survival in patients with melanoma. *Br J Dermatol.* 2016;174(1):146–51.
  20. Delyon J, Mateus C, Lefeuvre D, Lanoy E, Zitvogel L, Chaput N, et al. Experience in daily practice with ipilimumab for the treatment of patients with metastatic melanoma: A nearly increase in lymphocyte and eosinophil counts is associated with improved survival. *Ann Oncol.* 2013;24(6):1697–703.
  21. Gebhardt C, Sevko A, Jiang H, Lichtenberger R, Reith M, Tarnanidis K, et al. Myeloid cells and related chronic inflammatory factors as novel predictive markers in melanoma treatment with ipilimumab. *Clin Cancer Res.* 2015;21(24):5453–9.
  22. Bagley SJ, Kothari S, Aggarwal C et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio as a marker of outcomes in nivolumab-treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2017;106:1–7.
  23. Scilla KA, Bentzen SM, Lam VK et al. Neutrophil Lymphocyte Ratio Is a Prognostic Marker in Patients with Locally Advanced (Stage IIIA and IIIB) Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Combined Modality Therapy. *Oncologist.* 2017;22:737–42.
  24. Zer A, Sung M, Walia K et al. Correlation of Neutrophil to Lymphocyte Ratio (NLR) with Clinical Benefit from Checkpoint Inhibitors in Advanced Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2017;12:S1323-4.
  25. Galetta D, Logroscino AF, Misino A et al. Neutrophil/ Lymphocyte Ratio in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Correlation with Prognosis and Response to AntiPD1 Therapy. *J Thorac Oncol.* 2017;12(1):S1329-30.
  26. Preeshagul I, Sullivan K, Paul D et al. The Utilization of Pre-Treatment Neutrophil to Lymphocyte Ratio as a Predictive Marker for Efficacy of Immunotherapy in NonSmall Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2017;12(1):S1325.
  27. Mezquita L, Charrier M, Auclin E et al. Neutrophil-To-Lymphocyte and Other Ratios

- as Prognostic and Predictive Markers of Immune Checkpoint Inhibitors in Advanced NSCLC Patients. *J Thorac Oncol.* 2017;12(1):S1315-6.
28. Olugbile S, Kiyotani K, Inoue H et al. In-Depth Molecular Characterization of T Cell Clonal Expansion Induced by Anti-PD1 Therapy in NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2017;12(1):S1310-1.
  29. Schmidt H, Bastholt L, Geertsen P, Christensen IJ, Larsen S, Gehl J, et al. Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: A prognostic model. *Br J Cancer.* 2005;93(3):273–8.
  30. Atzpodien J, Reitz M. Peripheral Blood Neutrophils as Independent Immunologic Predictor of Response and Long-Term Survival upon Immunotherapy in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm.* 2008;23(1):129–34.
  31. Bellocq A, Antoine M, Flahault A, Philippe C, Crestani B, Bernaudin JF, et al. Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. *Am J Pathol.* 1998;152(1):83–92.
  32. Jensen HK, Donskov F, Marcussen N, Nordmark M, Lundbeck F, Von Der Maase H. Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(28):4709–17.
  33. Trellakis S, Bruderek K, Dumitru CA, Gholaman H, Gu X, Bankfalvi A, et al. Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: Enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *Int J Cancer.* 2011;129(9):2183–93.
  34. Reid MD, Basturk O, Thirabanjasak D, Hruban RH, Klimstra DS, Bagci P, et al. Tumor-infiltrating neutrophils in pancreatic neoplasia. *Mod Pathol.* 2011;24(12):1612–9.
  35. Halazun KJ, Hardy MA, Rana AA, Woodland IV DC, Luyten EJ, Mahadev S, et al. Negative impact of neutrophil-lymphocyte ratio on outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg.* 2009;250(1):141–51.
  36. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
  37. Yan L, Wu M, Ba N, Shi G, Wang L, Zhang H. Changes in T-lymphocytes in lung cancer patients after hyperthermic intraperitoneal chemotherapy or radiotherapy. 2016;15(2).
  38. Sharma P, Allison J. natural killer (NK) cells and mac- in cancer therapy in two ways. First,. *Science.* 2014.
  39. Talebian Yazdi M, Schinkelshoek MS, Loof NM, Taube C, Hiemstra PS, Welters MJ, et al. Standard radiotherapy but not chemotherapy impairs systemic immunity in non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology.* 2016;5(12):1–9.
  40. Almatroodi SA, McDonald CF, Collins AL, Darby IA, Pouniotis DS. Blood classical monocytes phenotype is not altered in primary non-small cell lung cancer. *World J Clin Oncol.* 2014;5(5):1078–87.

41. Lavin Y, Kobayashi S, Leader A, Amir E ad D, Elefant N, Bigenwald C, et al. Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. *Cell*. 2017;169(4):750–765.
42. Dutertre CA, Wang LF, Ginhoux F. Aligning bona fide dendritic cell populations across species. *Cell Immunol*. 2014;291(1–2):3–10.
43. Haniffa M, Collin M GF. Ontogeny and functional specialization of dendritic cells in human and mouse. *Adv Immunol*. 2013;120:1–49.
44. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu Rev Immunol*. Author manuscript; available in PMC 2013 December 06.
45. Schlitzer A, McGovern N, Teo P, Zelante T, Atarashi K, Low D, et al. IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b+Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. *Immunity*. 2013;38(5):970–83.
46. Adah D, Hussain M, Qin L, Qin L, Zhang J, Chen X. Implications of MDSCs-targeting in lung cancer chemo-immunotherapeutics. *Pharmacol Res*. 2016;110:25–34.
47. Huang A, Zhang B, Wang B, Zhang F, Fan K-X, Guo Y-J. Increased CD14+HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62(9):1439–51.
48. Scilla KA, Bentzen SM, Lam VK, Mohindra P, Nichols EM, Vyfhuis MA, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio is a prognostic marker in patients with locally advanced (stage IIIA and IIIB) non-small cell lung cancer treated with combined modality therapy. *Oncologist*. 2017;22(6):737–42.

## **ANEXOS**

11.01 - Lung Cancer

**14689**

## **MONITORING IMMUNODYNAMICS IN IMMUNE CHECKPOINT INHIBITOR THERAPY FOR STAGE IIIB/IV NON-SMALL CELL LUNG CANCER**

Lung cancer, Immunology, Biomarkers

**D. Bento<sup>1</sup>, J. S. Almeida<sup>2</sup>, P. Couceiro<sup>2</sup>, V. Alves<sup>3</sup>, M. Santos-Rosa<sup>3</sup>, F. J. Barata<sup>4</sup>, P. Rodrigues-Santos<sup>5</sup>, A. M. Ferreira Rodrigues Figueiredo<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Faculty of Medicine, University of Coimbra - Coimbra (Portugal), <sup>2</sup>Immunology and Oncology Laboratory, Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra; Center of Investigation in Environment, Genetics and Oncobiology, Faculty of Medicine, University of Coimbra - Coimbra (Portugal), <sup>3</sup>Immunology Institute, Faculty of Medicine, University of Coimbra; Center of Investigation in Environment, Genetics and Oncobiology, Faculty of Medicine, University of Coimbra - Coimbra (Portugal), <sup>4</sup>Pulmonology B Service, Coimbra Hospital and University Centre - Coimbra (Portugal), <sup>5</sup>Immunology Institute, Faculty of Medicine, University of Coimbra; Immunology and Oncology Laboratory, Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra; Center of Investigation in Environment, Genetics and Oncobiology, Faculty of Medicine, University of Coimbra - Coimbra (Portugal)

This prospective pilot study intended to evaluate the immunological status of 15 patients with stage IIIB/IV non-small cell lung cancer.

Flow cytometry was used to analyze peripheral blood from three groups of stage IIIB/IV NSCLC patients: newly diagnosed (DX), starting immunotherapy after chemo (CT), undergoing immunotherapy (IMT) with PD-1/PD-L1 blockade agents. Blood donors were used as controls (CTRL).

Most important finding consists in myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) significant increase in all NSCLC patients compared to CTRL, particularly monocytic MDSC (M-MDSC) defined as Lin-HLA-DR-CD33+CD11b+CD14+CD15-. Similarly, type 2 myeloid dendritic cells (mDC2), defined as Lin-HLA-DR+CD11c+CD123+, demonstrated the same results for IMT patients. Particular T cells subsets (T CD8, activated HLA-DR+CD38+ T CD8, memory CCR7-CD45RA+ T CD8 and Tregs), B cells (transitional CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>), NK cells (CD56<sup>bright</sup>) and NKT-like cells (CD3+CD56+) were found significantly increased in IMT patients. Preliminary results suggest in all NSCLC patients a significant decrease in the ratios of effector:suppressor cells (E:S ratio), considering MDSCs and Tregs as suppressors and CD8 T cells and NK cells as effectors. In IMT NSCLC patients, a significant decrease in PD-1-expressing cells, and in some cases, decrease of density of PD-1 was observed for T CD4 (including Th1), T CD8 (including Tc1) and Treg cells, monocytes, and dendritic cells.

In conclusion, alterations found in the analyzed subsets in IMT NSCLC patients could be important candidates for evaluation of response in immunotherapy in clinical practice. Further studies are necessary to validate data.

## Anexo 2 – Abstract submetido ao 3<sup>RD</sup> ASPIC International Congress

### Monitoring immunological status in immune checkpoint inhibitor therapy of stage IIIB/IV non-small cell lung cancer

Almeida, J.S.<sup>1,2</sup>; Bento, D.<sup>3,4</sup>; Couceiro, P.<sup>1,2</sup>, Alves, V.<sup>3,4</sup>, Santos-Rosa, M.<sup>3,4</sup>, Barata, F.<sup>3</sup>, Figueiredo, A.<sup>3</sup>, Rodrigues-Santos, P.<sup>1,2,4</sup>

1 – Immunology and Oncology Laboratory, Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Coimbra (Portugal).  
2 - Center of Investigation in Environment, Genetics and Oncobiology, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra (Portugal).

3 – Pulmonology B Service, Coimbra Hospital and University Centre, Coimbra (Portugal).

4 – Immunology Institute, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra (Portugal).

This prospective pilot study intended to evaluate the immunological status of 15 patients with stage IIIB/IV non-small cell lung cancer.

Flow cytometry was used to analyze peripheral blood from three groups of stage IIIB/IV NSCLC patients: newly diagnosed (DX), starting immunotherapy after chemo (CT), undergoing immunotherapy (IMT) with PD-1/PD-L1 blockade agents. Blood donors were used as controls (CTRL).

Most important finding consists in myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) significant increase in all NSCLC patients compared to CTRL, particularly monocytic MDSC (M-MDSC) defined as Lin-HLA-DR-CD33+CD11b+CD14+CD15-. Similarly, type 2 myeloid dendritic cells (mDC2), defined as Lin-HLA-DR+CD11c+CD123+, demonstrated the same results for IMT patients. Particular T cells subsets (T CD8, activated HLA-DR+CD38+ CD8 T, memory CCR7-CD45RA+ CD8 T and Treg cells) were found significantly increased in IMT patients. Preliminary results suggest in all NSCLC patients a significant decrease in the ratios of effector:suppressor cells (E:S *ratio*), considering MDSCs and Tregs as suppressors and CD8 T cells and NK cells as effectors. In IMT NSCLC patients, a significant decrease in PD-1-expressing cells, and in some cases, decrease of density of PD-1 was observed for CD4 T (including Treg cells) and CD8 T cells, monocytes and dendritic cells.

In conclusion, alterations found in the analyzed subsets in IMT NSCLC patients could be important candidates for evaluation of response in immunotherapy in clinical practice. Further studies are necessary to validate data.

Funded by the FEDER Funds through the Operational Program Competitiveness Factors - COMPETE 2020 and by National Funds through the FCT - Foundation for Science and Technology within the framework of the Strategic Project with reference assigned by COMPETE: POCI-01-0145-FEDER-007440.



## **Anexo 3 – Consentimento informado**

### **MONITORIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DA TERAPIA COM INIBIDORES DOS CHECKPOINTS IMUNOLÓGICOS EM PACIENTES COM CANCRO DO PULMÃO – DOCUMENTO INFORMATIVO**

**Âmbito do estudo:** Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos estudos sobre o papel do sistema imunitário no controlo do cancro do pulmão. Ao invés de usar medicamentos que matam as células cancerígenas, estuda-se a possibilidade de estimular o sistema imunitário do doente de forma a atacar o tumor.

Este estudo pretende avaliar o estado imunológico de doentes com cancro do pulmão que possam ser tratados com este tipo de terapêutica imunológica, de forma a tentar estabelecer novos dados que permitam avaliar se o doente vai ter resposta a estas novas terapêuticas.

#### **Porque fui escolhido para este estudo?**

A população-alvo do presente estudo engloba todos os doentes com cancro do pulmão que estejam já a fazer ou possam vir a fazer mais tarde tratamento com terapêuticas no Serviço de Pneumologia B do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Por preencher estes critérios, foi selecionado para fazer parte do mesmo.

#### **O que tenho de fazer?**

Com o intuito avaliar o seu estado imunológico, vamos recolher uma amostra de sangue periférico (3 tubos de hemograma – EDTA e 2 tubos de heparina: o equivalente a cerca 15ml de sangue)

#### **Que benefícios ou custos terei com este estudo?**

A participação neste estudo é voluntária e não inclui nenhum tipo de pagamento ou custo para o participante.

#### **Quem terá acesso aos meus dados?**

Apenas a equipa de investigação terá acesso aos seus dados, garantindo o sigilo dos mesmos. A informação, depois de recolhida, será codificada para garantir total anonimato.

#### **Se aceitar participar e mudar posteriormente de ideias, posso desistir?**

Tal como referido, sendo um estudo de participação voluntária, pode em todos os momentos e sem qualquer prejuízo no seu atendimento normal desistir da participação. Ser-lhe-á

apenas solicitada uma justificação genérica do motivo de desistência para efeitos de validade científica.

**Caso aceite o convite de participar neste estudo, queira por favor proceder à assinatura do consentimento informado que se anexa a este documento. A equipa aproveita também para lhe deixar um agradecimento pela participação, estando disponível para quaisquer esclarecimentos adicionais.**

O Investigador,

Ana Maria Figueiredo

Hospital Geral – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Telefone 239 800 060

## CONSENTIMENTO INFORMADO

1. Confirmando ter lido e compreendido a folha de informação relativa ao estudo acima referido. Tive oportunidade de colocar questões e todas as minhas perguntas foram devidamente respondidas e esclarecidas.
2. Entendo que a minha participação é voluntária e que, em qualquer altura, disponho de liberdade total para desistir do estudo, sem que seja necessário justificar-me e sem que os meus direitos médicos e legais sejam afetados.
3. É da minha vontade que participe neste estudo.
4. Entendo que os responsáveis por esta investigação terão acesso aos meus registos e poderão utilizá-los na realização do estudo referido. Por conseguinte, autorizo essas pessoas a utilizarem os dados constantes no meu historial clínico, tendo consciência que irão manter sigilo e de que a lei de dados aplicável será respeitada.

**DATA:** \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

**Assinatura do doente:**

---

**Assinatura do médico recrutador:**

---

**Contactos da Equipa de Investigação:**

- Investigador: Ana Maria Figueiredo
- Telefone: 239 800 060
- Local de trabalho: Hospital Geral – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

## Anexo 4 – Tabela S1 de Anticorpos utilizados

Anticorpo	Conjugado	Clone	Fabricante	Referência
CD3	V450	ICHT1	BD	561416
CD3	APC-H7	SK7	BD	560176
CD3	PerCp-Cy5.5	HIT3a	Biolegend	300328
CD4	PerCp-Cy5.5	OKT4	Biolegend	317428
CD8	APC-H7	HIT8a	BD	641400
CD11b	APC	ICRF44	Biolegend	301310
CD11c	PE/Cy7	B-ly6	BD	561356
CD14	V450	MOP9	BD	560349
CD15	PE/Cy7	HI98	BD	560827
CD16	APC-Cy7	3G8	Biolegend	302018
CD19	PerCp-Cy5.5	HIB19	Biolegend	302230
CD24	FITC	ML5	BD	555428
CD25	PE	M-A251	BD	555432
CD27	PE/Cy7	M-T271	BD	560609
CD33	PE	WM53	BD	555450
CD38	APC	HIT2	BD	555462
CD45	FITC	HI30	BD	555482
CD45RA	PE/Cy7	5H9	BD	561216
CD45RO	APC-H7	UCHL1	BD	561137
CD56	PerCp-Cy5.5	HCD56	BD	560842
CD56	PE	B159	Biolegend	318306
CD123	PerCp-Cy5.5	6H6	Biolegend	306016
CD127	AF647	HIL-7R-M21	BD	558598
CD183 (CXCR3)	PE	IC6/CXCR3	BD	550633
CD194 (CCR4)	PE/Cy7	IG1	BD	577864
CD196 (CCR6)	PE/Cy7	11A9	BD	560620
CD197 (CCR7)	PE	150503	BD	560765
CD274 (PD-L1)	FITC	MIH1	BD	558065
CD279 (PD-1)	FITC	MIH4	BD	557860
CD279 (PD-1)	APC	MIH4	BD	558694
CD279 (PD-1)	PE	MIH4	BD	557946
HLA-DR	V500	G46-6	BD	561224
IgD	V500	IAS6-2	BD	561490

## Anexo 5- Estratégia de *Gating*

Para amostras de sangue periférico, a discriminação de linfócitos foi baseada em SSC-A e FSC-A. As células T foram selecionadas por positividade ao anticorpo CD3 e foram discriminadas com um *plot* CD4 versus CD8, para identificar as células T CD4 e T CD8, bem como, células duplamente positivas (CD4+ CD8+) e negativas (CD4- CD8-). As subpopulações T CD4 e T CD8 foram identificadas através dos anticorpos CD45RA versus CCR7, células naïve (CD45RA+ CCR7 +), células de memória central (CD45- CCR7 +), células de memória efetoras (CD45RA- CCR7-) e células efetoras (CD45RA+ CCR7-). O estado de ativação das células T CD4 e T CD8 foi determinado pela presença de células HLA-DR+ e CD38+ (Figura S1). Relativamente às células T CD4, os anticorpos CX3CR1 e CCR6 permitiram a discriminação entre células Th1 (CX3CR1+ CCR6-), Th17 (CX3CR1- CCR6 +) e células Th2 (CX3CR1-CCR6-). Para as células T CD8, a mesma estratégia foi utilizada para identificar células Tc1 (CX3CR1+ CCR6-), Tc17 (CX3CR1- CCR6 +) e Tc2 (CX3CR1- CCR6-) (Figura S2). Dentro das células T CD4, as células TReg foram identificadas por negatividade ao anticorpo CD127 e positividade aos anticorpos CD25 e CCR4; o CD45RO foi usado para discriminar células TReg naïve (CD45RO) e de memória (CD45RO +) (Figura S3).

Relativamente aos linfócitos B, identificados pelo anticorpo CD19, subpopulações de células B foram diferenciadas em um diagrama CD27 versus IgD, para identificar células naïve (IgD+ CD27-), *pré-switch memory cells* (IgD+ CD27+), *switch memory cells* (IgD- CD27 +) e *exhausted cells* (IgD-CD27-). Dentro das subpopulações de células B naïve e *switch memory*, foram identificadas as células B de transição e os plasmablastos por dupla positividade aos anticorpos CD38 e CD24, respetivamente (Figura S4).

As células NK foram identificadas pela presença de anticorpo CD56 e ausência de anticorpo CD3, e com a intensidade fluorescente do anticorpo CD56, diferenciamos em

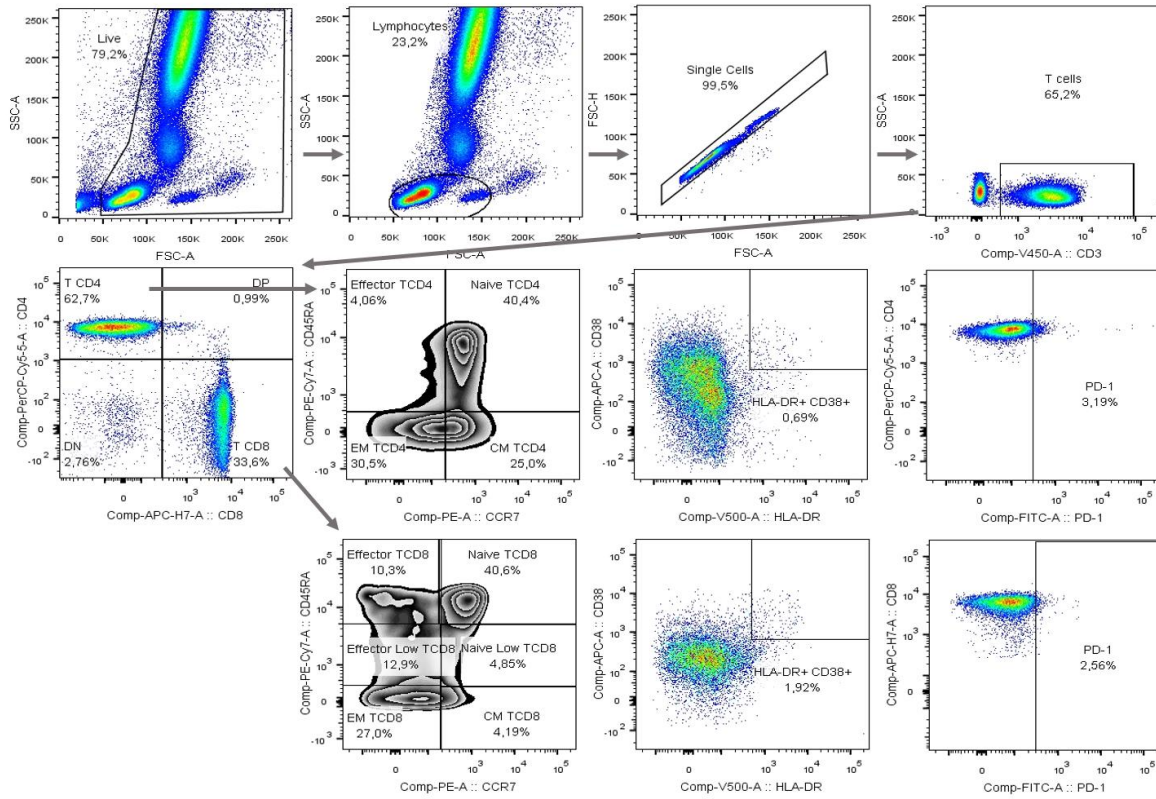
células NK CD56bright e as células NK CD56dim. O estado de ativação das células NK foi determinado pela presença de células HLA-DR + (Figura S5).

Para a identificação de monócitos e células dendríticas, as células mononucleares do sangue periférico foram selecionadas em um *plot* SSC-A e FSC-A. Para identificação de monócitos, foi utilizado o anticorpo CD14 como marcador específico, sendo excluídas células positivas para os anticorpos CD3, CD19, CD20 e CD56; a expressão de HLA-DR também foi avaliada. Para a discriminação das células dendríticas, os anticorpos CD3, CD19, CD20, CD56 e CD14 foram utilizados como marcadores negativos e o anticorpo HLA-DR como marcador específico. As subpopulações de células dendríticas foram identificadas recorrendo a anticorpos CD11c e CD123, células dendríticas mieloides tipo I (CD11c+ CD123-), células dendríticas mieloides tipo II (CD11c+ CD123-) e células dendríticas plasmocitóides (CD11c- CD123 +) (Figura S6).

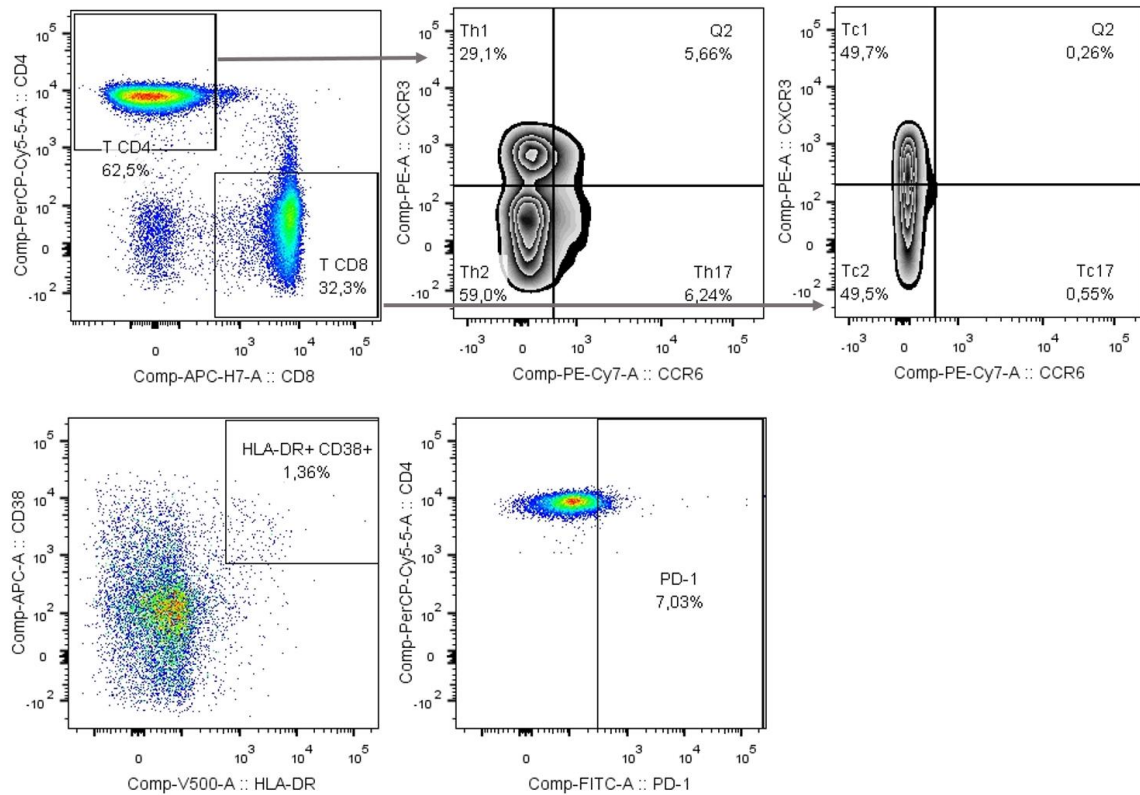
As células supressoras de origem mielóide (MDSCs) foram identificadas pela negatividade ao CD16, HLA-DR, CD3, CD19 e CD56, e por apresentarem positividade ao CD45, CD33 e CD11b. Dentro da população de MDSCs, um diagrama CD15 versus CD14, permitiu discriminar e-MDSCs (CD15- CD14-), PMN-MDSCs (CD15+ CD14-) e M-MDSCs (CD15- / + CD14+) (Figura S7).

Usando a mesma estratégia de *gating* para cada população, também utilizamos anticorpos PD-1 e PD-L1 para avaliar a percentagem de células positivas, e recorrendo à intensidade mediana de fluorescência (MFI) determinar a densidade de antígeno desses receptores por célula.

Todas as amostras foram analisadas com o software FlowJo v.10.7 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

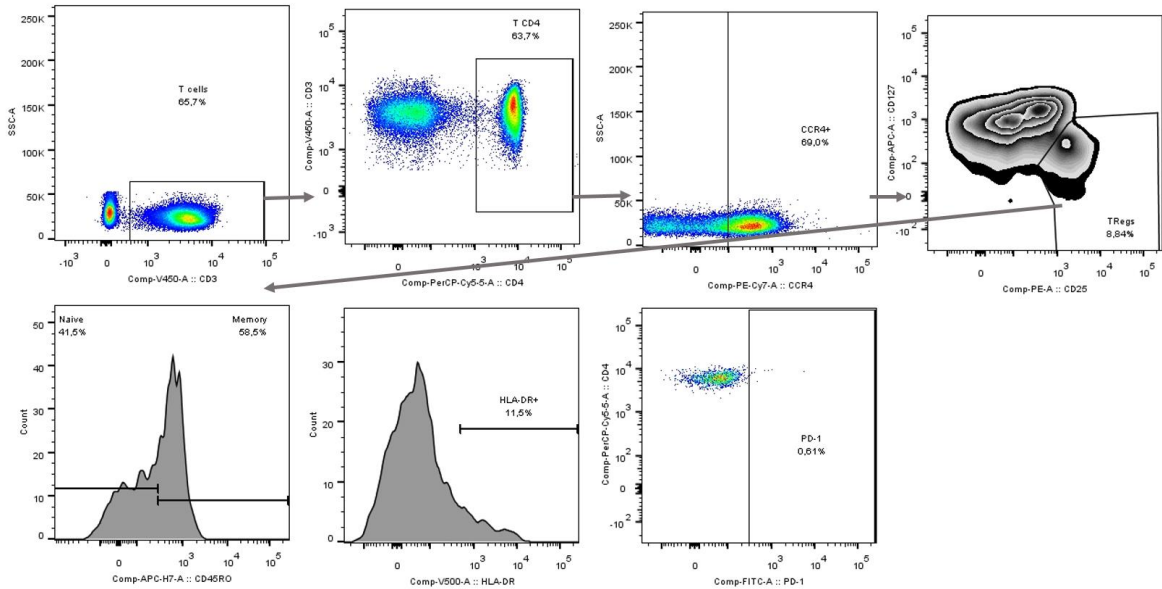


**Figura S1. Discriminação de células T em doentes com cancro do pulmão de não pequenas células.** Para amostras de sangue periférico, a discriminação de linfócitos foi baseada em SSC-A e FSC-A. As células T foram selecionadas por positividade ao anticorpo CD3 e foram discriminadas com um *plot* CD4 versus CD8, para identificar as células T CD4 e T CD8, bem como, células duplamente positivas (CD4+ CD8+) e negativas (CD4- CD8-). As subpopulações T CD4 e T CD8 foram identificadas através dos anticorpos CD45RA versus CCR7, células naïve (CD45RA+ CCR7 +), células de memória central (CD45- CCR7 +), células de memória efetoras (CD45RA- CCR7-) e células efetoras (CD45RA+ CCR7-). O estado de ativação das células T CD4 e T CD8 foi determinado pela presença de células HLA-DR+ e CD38+. Dentro das células T CD4 e T CD8 determinou-se a presença do recetor PD-1.

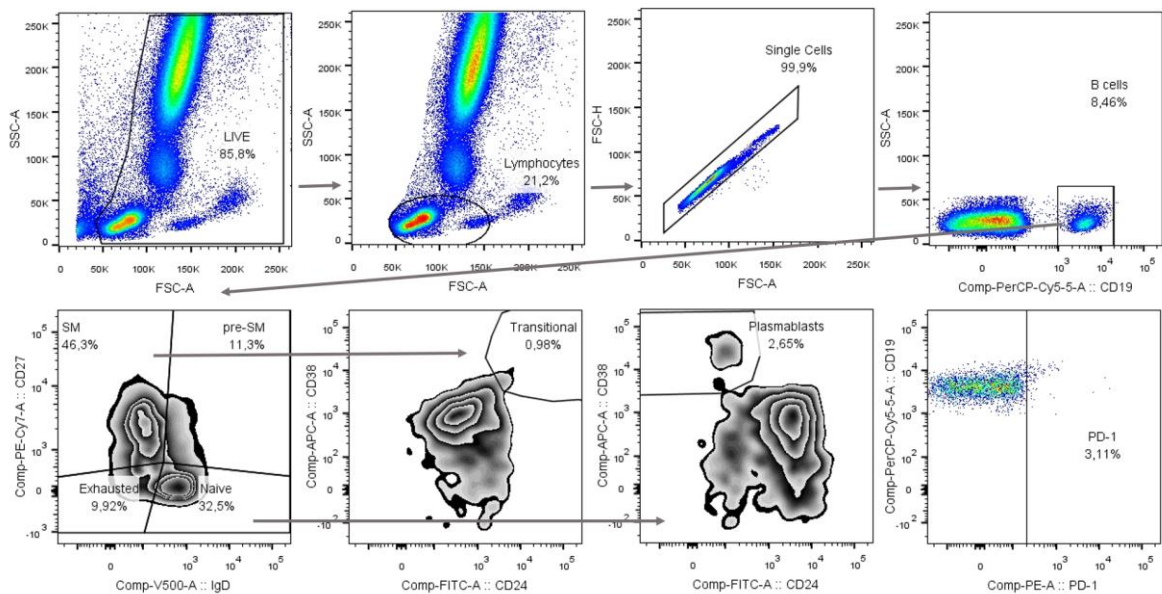


**Figura S2. Discriminação de células T CD4 e T CD8 em doentes com cancro do pulmão de não pequenas células.** Dentro das células T CD4, os anticorpos CX3CR1 e CCR6 permitiram a discriminação entre células Th1 (CX3CR1+ CCR6-), Th17 (CX3CR1- CCR6 +) e células Th2 (CX3CR1-CCR6-). Para as células T CD8, a mesma estratégia foi utilizada para identificar células Tc1 (CX3CR1+ CCR6-), Tc17 (CX3CR1- CCR6 +) e Tc2 (CX3CR1- CCR6-). Dentro das subpopulações discriminadas anteriormente determinou-se a presença do recetor PD-1.

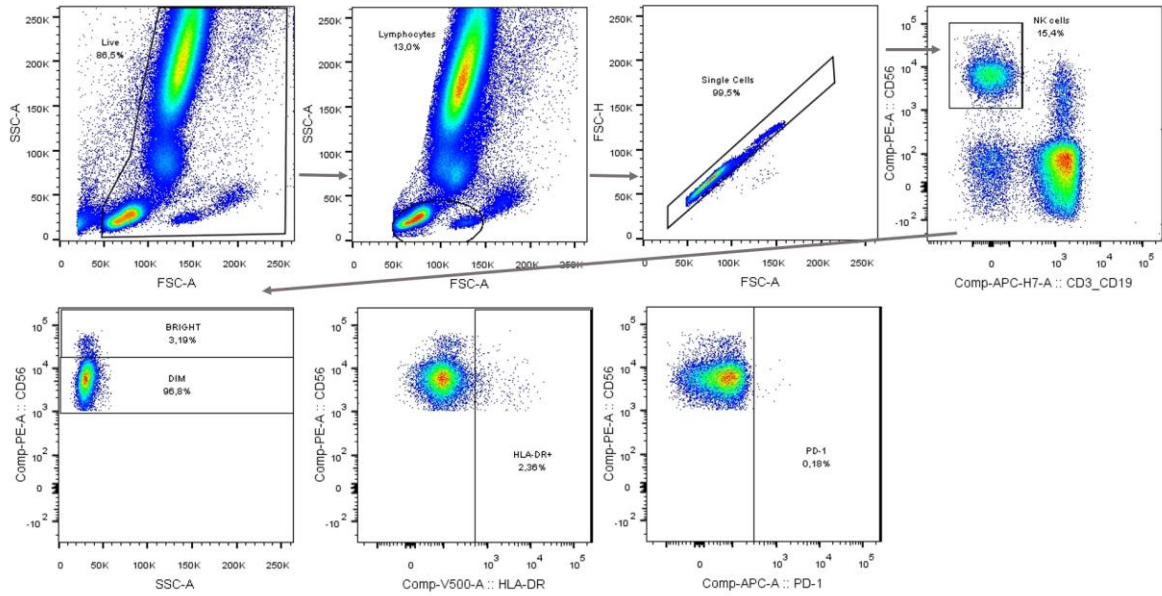




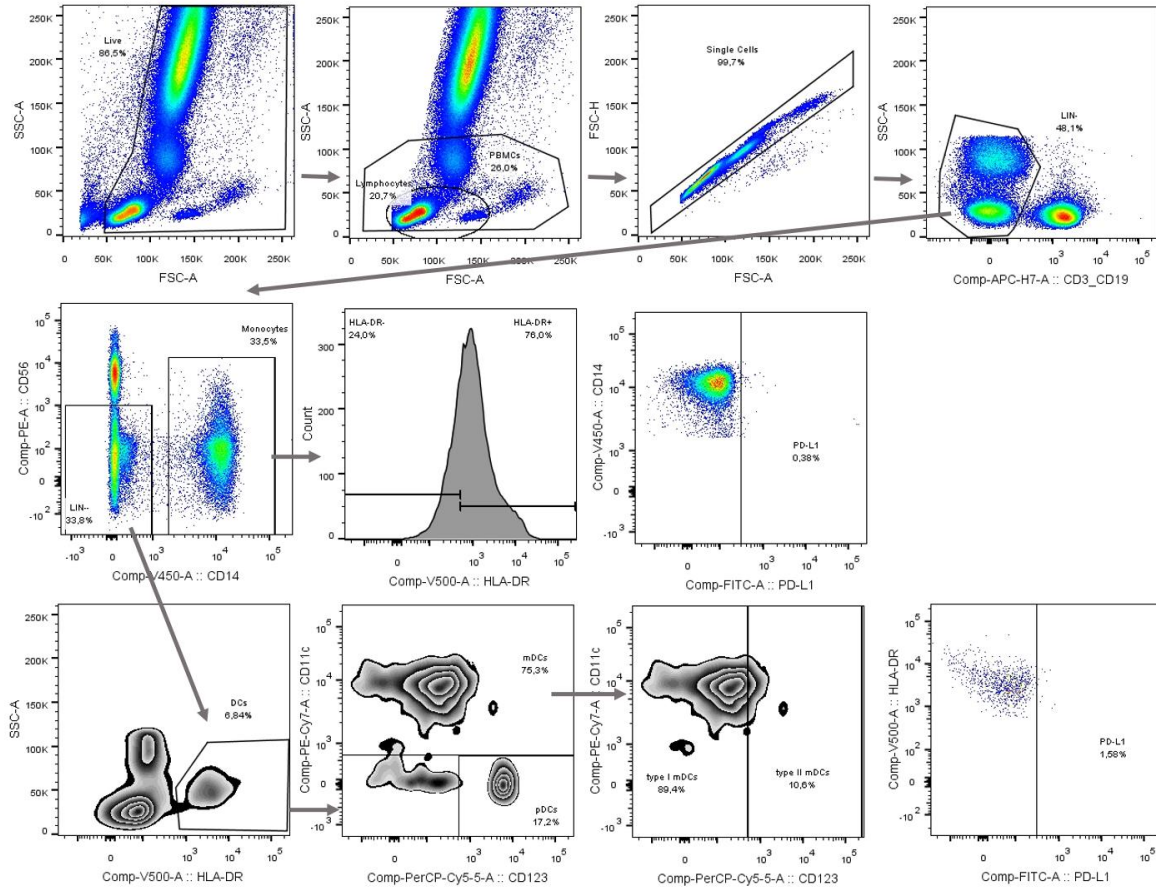
**Figura S3. Discriminação de células T CD4 em doentes com cancro do pulmão de não pequenas células.** Dentro das células T CD4, as células TReg foram identificadas por negatividade ao anticorpo CD127 e positividade aos anticorpos CD25 e CCR4; o CD45RO foi usado para discriminar células TReg naïve (CD45RO-) e de memória (CD45RO+). Determinou-se a presença do recetor PD-1 nesta população.



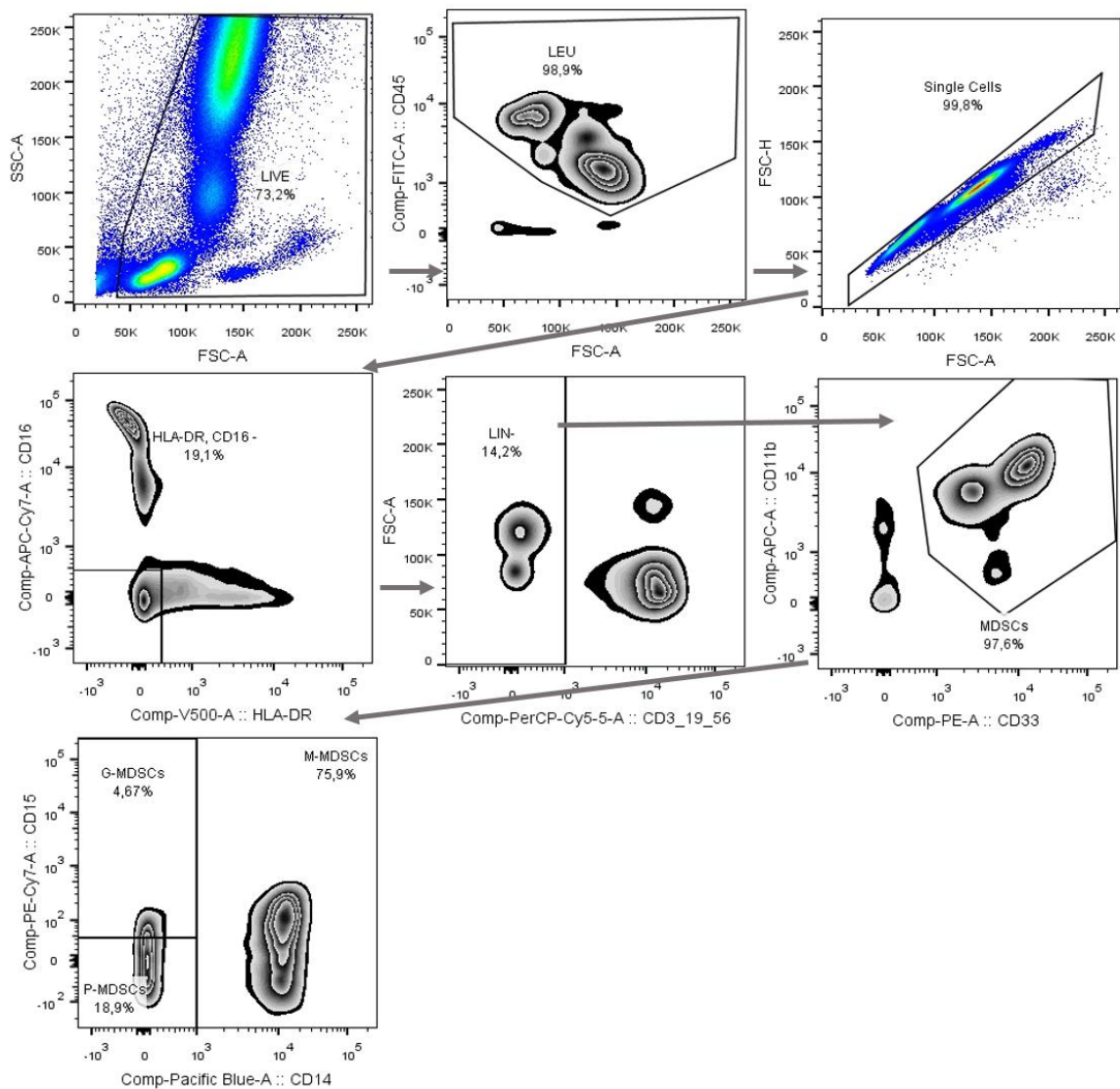
**Figura S4. Discriminação de linfócitos B e suas subpopulações em doentes com cancro do pulmão de não pequenas células.** Relativamente aos linfócitos B, identificados pelo anticorpo CD19, subpopulações de células B foram diferenciadas em um diagrama CD27 versus IgD, para identificar células naïve (IgD+ CD27-), pré-switch memory cells (IgD+ CD27+), switch memory cells (IgD- CD27+) e exhausted cells (IgD-CD27-). Dentro das subpopulações de células B naïve e switch memory, foram identificadas as células B de transição e os plasmablastos por dupla positividade aos anticorpos CD38 e CD24, respetivamente. Dentro das células B determinou-se a presença do recetor PD-1.



**Figura S5. Discriminação de células NK em doentes com cancro do pulmão de não pequenas células.** As células NK foram identificadas pela presença de anticorpo CD56 e ausência de anticorpo CD3, e com a intensidade fluorescente do anticorpo CD56, diferenciamos em células NK CD56bright e as células NK CD56dim. O estado de ativação das células NK foi determinado pela presença de células HLA-DR +. Avaliou-se a presença do recetor PD-1 nestas células.



**Figura S6. Discriminação de monócitos e células dendríticas em doentes com cancro do pulmão de não pequenas células.** Para a identificação de monócitos e células dendríticas, as células mononucleares do sangue periférico foram selecionadas em um *plot* SSC-A e FSC-A. Para identificação de monócitos, foi utilizado o anticorpo CD14 como marcador específico, sendo excluídas células positivas para os anticorpos CD3, CD19, CD20 e CD56; a expressão de HLA-DR também foi avaliada. Para a discriminação das células dendríticas, os anticorpos CD3, CD19, CD20, CD56 e CD14 foram utilizados como marcadores negativos e o anticorpo HLA-DR como marcador específico. As subpopulações de células dendríticas foram identificadas recorrendo a anticorpos CD11c e CD123, células dendríticas mieloides tipo I (CD11c+ CD123-), células dendríticas mieloides tipo II (CD11c+ CD123-) e células dendríticas plasmocitóides (CD11c-CD123+). Dentro dos monócitos e das células dendríticas avaliou-se a presença do recetor PD-1.



**Figura S7. Discriminação de células supressoras de origem mielóide (MDSCs) e suas subpopulações em doentes com cancro do pulmão de não pequenas células.** As células supressoras de origem mielóide (MDSCs) foram identificadas pela negatividade ao CD16, HLA-DR, CD3, CD19 e CD56, e por apresentarem positividade ao CD45, CD33 e CD11b. Dentro da população de MDSCs, um diagrama CD15 versus CD14, permitiu discriminar e-MDSCs (CD15- CD14-), PMN-MDSCs (CD15+ CD14-) e M-MDSCs (CD15- / + CD14+).