

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Ricardo Antunes Portugal

“Dados do mundo real relativos ao tratamento com  
pembrolizumab de doentes com cancro do pulmão de  
células não-pequenas em estadio avançado  
previamente tratados”

Dissertação no âmbito do Mestrado em Farmacologia Aplicada orientada pela  
Professora Doutora Maria Teresa Teixeira Cruz Rosete e Dra. Joana Isabel Dias da  
Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

outubro de 2020





UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Ricardo Antunes Portugal

**“Dados do mundo real relativos ao tratamento com  
pembrolizumab de doentes com cancro do pulmão  
de células não-pequenas em estadio avançado  
previamente tratados”**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Farmacologia Aplicada orientada pela Professora Doutora Maria Teresa Teixeira Cruz Rosete e Dra. Joana Isabel Dias da Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

outubro de 2020

**“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito curta, para ser insignificante”**

- Charlie Chaplin

## **Agradecimentos**

No fechar de mais um capítulo do meu livro da vida sinto-me no dever de agradecer a todos os que contribuíram para o sucesso do meu trajeto.

Ao finalizar este momento da minha vida acadêmica, apercebo-me de que os últimos cinco anos da minha existência nesta faculdade e nesta cidade revelaram ser dos anos mais importantes para o meu conhecimento e, sobretudo, crescimento enquanto ser humano. Por isso, estou eternamente grato.

Inicialmente quero agradecer aos meus pais e irmão por todo o amor, chamadas de atenção e por todos os esforços por que tiveram de passar para que pudesse concluir esta etapa. Muito obrigado por estarem sempre presentes.

Quero agradecer à minha namorada por todo o amor, paciência e ajuda nos momentos que mais precisei. Contigo tudo se torna mais fácil.

Agradeço às minhas incansáveis orientadoras nesta dissertação, Professora Doutora Maria Teresa da Teixeira Cruz Rosete e Dra. Joana Isabel Dias da Silva por todo o apoio, paciência e conhecimento. Nada disto seria possível sem a vossa ajuda.

Por fim, mas não menos importante queria agradecer a todos os meus amigos por em todos os momentos mais difíceis me ajudarem a permanecer mentalmente saudável durante todo este processo.

O sucesso só atravessa a nossa vida se formos dedicados, trabalhadores e, acima de tudo, se acreditarmos nas nossas capacidades.

Muito obrigado a todos.

## Índice

Índice de Tabelas.....	III
Índice de Figuras.....	III
Lista de Abreviaturas.....	IV
Sumário.....	I
Summary.....	3
1. Introdução.....	5
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA: TRATAMENTO COM PEMBROLIZUMAB DE DOENTES PREVIAMENTE TRATADOS, COM CANCRO DO PULMÃO DE NÃO-PEQUENAS CÉLULAS EM ESTADIO AVANÇADO</b> .....	<b>6</b>
2.1. Cancro do Pulmão .....	6
2.1.1. Estatísticas no cancro do pulmão .....	6
2.1.2. Impacto Socioeconómico .....	11
2.1.3. Classificação do Cancro do Pulmão.....	13
2.1.4. Estadiamento do Cancro do Pulmão .....	17
2.1.5. Cancro do Pulmão de não-pequenas células (CPNPC) .....	19
2.1.5.1. Biologia e mecanismos imunes envolvidos .....	19
2.1.5.2. Guidelines Terapêuticas.....	22
• Guidelines e recomendações para estadios precoces.....	23
• Guidelines para estadios localmente avançados (estadios III) .....	24
• Guidelines para estadios avançados (estadio IV) .....	24
2.2. Imunoterapia no Cancro.....	27
2.2.1. Conceitos gerais .....	27
2.2.2. Opções terapêuticas na imunoterapia.....	30
2.2.2.1. Citocinas .....	31
2.2.2.2. Vacinas Terapêuticas cancerígenas .....	32
• Vacinas de células tumorais .....	33
• Vacinas de células dendríticas.....	34
• Vacinas Terapêuticas baseadas em proteínas/peptídeos.....	35
• Vacinas Terapêuticas Genéticas.....	37
• Vacinação no CPNPC .....	38
2.2.2.3. Terapêutica com células T adotadas (CTA).....	39
2.2.2.4. Coestimulação e coinibição de células T .....	41
2.2.2.5. Inibidores de checkpoint imunitários.....	42
2.3. Pembrolizumab.....	43
2.3.1. Propriedades Farmacológicas, características do fármaco e mecanismo de ação .....	43
2.3.2. Perfil de Segurança .....	44

2.3.3. Estudos clínicos e resultados do uso de pembrolizumab em doentes com CPNPC em estadio avançado.....	46
<b>3. METODOLOGIA – ESTUDO OBSERVACIONAL UNICÊNTRICO DE DADOS DO MUNDO REAL RELATIVOS AO TRATAMENTO COM PEMBROLIZUMAB DE DOENTES PREVIAMENTE TRATADOS, COM CANCRO DO PULMÃO DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS EM ESTADIO AVANÇADO .....</b>	<b>48</b>
3.1. Introdução.....	48
3.2. Desenho e aprovação do estudo.....	48
3.3. Avaliações.....	49
3.4. Análise Estatística .....	50
3.5. Objetivos.....	50
3.6. População e Amostra .....	51
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
4.1. Características demográficas e do tumor.....	51
4.2. Perfil de Eficácia .....	52
4.3. Perfil de Segurança .....	53
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>65</b>

## Índice de Tabelas

Tabela 1- Classificação de tumores pulmonares pela Organização Mundial da Saúde.....	13
Tabela 2- Comparação da patologia do adenocarcinoma pulmonar de 2004 e 2015. ....	15
Tabela 3- Classificação dos descritores TNM.....	18
Tabela 4- Estadiamento da 8ª edição TNM.....	19
Tabela 5- Características demográficas e do tumor (n=19).....	52
Tabela 6- Efeitos adversos relacionados com o tratamento.....	54

## Índice de Figuras

Figura 1- Incidência e mortalidade no cancro em 2018.....	7
Figura 2- Incidência e mortalidade do cancro no homem e na mulher em 2018.....	9
Figura 3 - Incidência e mortalidade do cancro no homem e na mulher em 2012.....	10
Figura 4 - Os dez <i>Hallmarks</i> presentes em células tumorais.....	20
Figura 5 - Algoritmo de tratamento no CPNPC em estadio IV.....	26
Figura 6 - Imunoedição tumoral.....	28
Figura 7 - Reações imunológicas de vacinas ativadas em antígenos associados ao tumor membranare .....	33
Figura 8 - Tipos de modificação dos recetores das células T.....	40
Figura 9 - Gráfico da função de sobrevivência e sobrevivência cumulativa.....	53

## Lista de Abreviaturas

ADN - Ácido desoxirribonucleico

AIS - Adenocarcinoma in situ

ALK - *Anaplastic lymphoma kinase*

AMI - Adenocarcinoma minimamente invasivo

ARN - Ácido ribonucleico

AUC - Área sob a curva

BF - Broncofibroscopia

CAR - *Chimeric antigenic receptors*

CD - Células dendríticas

CHUC- Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra

CMH - Complexo major de histocompatibilidade

CPNPC - Cancro do pulmão de não-pequenas células

CPPC - cancro do pulmão de pequenas células

CTA - terapêutica com células T adotadas

CTLA-4 - *Citotoxic T lymphocyte antigen 4*

DALY - *Disability Adjusted Life Years*

DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crónica

EBUS - Ultrassonografia endobronquica para avaliar regiões linfáticas

ECOG - *Eastern Cooperative Oncology Group*

EGFR - *Epidermal growth receptor*

ESMO - Sociedade Europeia de Oncologia Médica

FDA - *Food and Drug Administration*

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

IC - Intervalo de confiança

ICI - Inibidores de checkpoints imunitários

IFN - interferão

IL - Interleucina

KRAS - *Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog*

LIT - Linfócitos infiltrados no tumor

MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinase*  
mARN - *Ácido ribonucleico mensageiro*  
MEK - *Mitogen-activated protein kinase*  
NK - *Natural killer*  
OMS - *Organização Mundial de Saúde*  
PD- L2 - *programmed death ligand 2*  
PD-1- *programmed death 1*  
PD-L1 - *programmed death ligand 1*  
PS - *Performance status*  
RAS - *Rat Sarcoma virus*  
RCT - *receptores das células T*  
RECIST - *Critérios de Avaliação de Tumores Sólidos*  
SABR - *Radioterapia estereotáxica ablativa*  
SG - *Sobrevivência global*  
SI - *Sistema Imunitário*  
SLP - *Sobrevivência livre de progressão*  
TAC - *Tomografia axial computadorizada*  
TEP - *tomografia por emissão de positrões*  
TLR - *Toll like receptor*  
TPS - *Tumor proportion score*  
VTC - *Vacinas terapêuticas cancerígenas*  
WHO - *World Health Organization*

## **Sumário**

Mundialmente, o cancro do pulmão de não-pequenas células (CPNPC) é o tipo de cancro que causa mais mortes, tanto em homens como em mulheres. Desde os finais da década de 90 que a quimioterapia constitui o tratamento de primeira linha para doentes com CPNPC. Posteriormente, a introdução da imunoterapia no tratamento de CPNPC tem demonstrado grandes benefícios terapêuticos, nomeadamente no aumento da esperança média de vida dos doentes. O pembrolizumab é um anticorpo monoclonal humanizado, bloqueador dos recetores *Programmed Death-1* (PD-1) presentes nos linfócitos T, que impede que estes estabeleçam ligação com os respetivos ligandos imunossuppressores presentes nas células tumorais, *Programmed Death – Ligand 1* (PD-L1) e PD-L2. Consequentemente, o pembrolizumab permite a proliferação de células T, a produção de citocinas inflamatórias e uma resposta anti-tumoral. Quando comparado com a quimioterapia clássica em ensaios clínicos, o pembrolizumab demonstrou melhores resultados relativamente à sobrevivência global e sobrevivência livre de progressão de doença. Adicionalmente, a ocorrência de efeitos adversos relacionados com o tratamento com pembrolizumab também é inferior relativamente aos despoletados pela quimioterapia. No entanto, os dados clínicos sobre a utilização deste anticorpo são escassos. Tendo em conta o exposto, o objetivo geral deste projeto consistiu na recolha e análise retrospectiva de dados de eficácia e segurança do pembrolizumab para o tratamento de doentes com CPNPC em estadio avançado, obtidos na prática clínica em contexto de vida real comparando-os com os dados reportados em ensaios clínicos.

## **Materiais e métodos**

A recolha dos dados do presente estudo foi feita num horizonte temporal de 14 meses no Serviço de Pneumologia B do Hospital Geral – CHUC, onde se incluíram todos os doentes com CPNPC com idade superior a 18 anos cujas características tiveram de obedecer a determinados critérios de inclusão e exclusão. Os dados sociodemográficos e clínicos relacionados com o doente foram recolhidos através da base de dados de diários clínicos dos doentes presentes no CHUC, garantindo-se sempre a privacidade de dados pessoais, através da sua anonimização (regulamento Geral de Proteção de Dados 2016/679). Os dados foram recolhidos, analisados e posteriormente tratados através do programa IBM SPSS® Statistics software.

## **Resultados**

Neste estudo foram incluídos 19 doentes sujeitos a tratamento com pembrolizumab de 3 em 3 semanas e que demonstraram progressão da doença após tratamento com quimioterapia. Ao longo do estudo, 6 doentes (31,58%) morreram e 8 (42,11%) apresentaram progressão de doença. A sobrevivência livre de progressão (SLP) foi de 11,7 meses, superior aos 4 meses reportados em ensaio clínico. Dos 19 doentes, 16 tiveram pelo menos um evento adverso de qualquer grau. As toxicidades mais comuns foram a fadiga/astenia com 15 eventos (15,69%) e edemas, *rash* e dor com 6 eventos cada um, ou seja, 11,76% para cada um dos eventos.

## **Conclusão**

Com a realização deste estudo verificou-se que o uso de pembrolizumab em segunda linha no tratamento do CPNPC, apesar de evidenciar um valor de SLP diferente do reportado em ensaio clínico, demonstrou um benefício clínico de sobrevivência significativo, com um perfil de segurança favorável quando administrado em contexto de vida real.

**Palavras-chave:** Cancro do Pulmão; Cancro do pulmão de não-pequenas células; Imunoterapia; anti-PD1; Pembrolizumab.

## **Summary**

Worldwide, non-small cell lung cancer (NSCLC) is the type of cancer that causes the most deaths, both in men and women. Since the late 1990s, chemotherapy has been the first-line treatment for patients with NSCLC. The subsequent introduction of immunotherapy for the treatment of NSCLC has shown great therapeutic benefits, namely in increasing the average life expectancy of patients. Pembrolizumab is a humanized monoclonal antibody, a PD-1 receptors blocker, present in T lymphocytes, which prevents them from establishing connection with tumor ligands and immunosuppressants PD-L1 and PD-L2. Consequently, pembrolizumab promotes the proliferation of T cells, the production of inflammatory cytokines and an anti-tumor response. When compared to classic chemotherapy in clinical trials, pembrolizumab has shown better results in overall survival and progression-free survival. In addition, the occurrence of adverse effects related to treatment with pembrolizumab is also lower compared to chemotherapy. However, clinical data on the use of this antibody are scarce. In view of the above, the general objective of this project is to collect and retrospectively analyze data on the efficacy and safety of pembrolizumab for the treatment of patients with advanced NSCLC, comparing them with data reported in clinical trials.

## **Materials and Methods**

Data collection for this study was carried out in a compressed period of 14 months at the Pulmonology B Service of Hospital Geral - CHUC, where only patients with NSCLC aged over 18 years whose characteristics had to fill in certain inclusion and exclusion criterias were included. The sociodemographic and clinical data related to the patient were collected through the database of clinical diaries of patients present at CHUC, always guaranteeing the privacy of personal data, through their anonymization (General Data Protection Regulation 2016/679). The data were collected, analyzed and later processed using the IBM SPSS® Statistics software.

## **Results**

This study included 19 patients treated with pembrolizumab every 3 weeks, after showing disease progression when being treated with chemotherapy. Throughout the study about 6 patients (31.58%) died and 8 (42.11%) of these had disease progression. Progression-free survival (SLP) was 11.7 months, higher than the 4 months reported in a clinical trial. Of the 19 patients, 16 had at least one adverse event of any degree. The most common toxicities were fatigue/asthenia with 15 events (15.69%) and edema, rash and pain with 6 events each, that is, 11.76% for each event.

## **Conclusion**

With this study, it was found that the use of pembrolizumab in second line of treatment of NSCLC, despite showing a different SLP value than that reported in a clinical trial, demonstrated a significant clinical survival benefit, with a favorable safety profile when administered in a real-life context.

**Keywords:** Lung cancer; Non-small cell lung cancer; Immunotherapy; anti-PD1; Pembrolizumab.

## I. Introdução

O cancro continua a ser umas das principais causas de morte mundialmente. Em 2018 o cancro do pulmão originou cerca de 1,8 milhões de mortes (Bray *et al.*, 2018).

O avanço tecnológico permitiu à medicina, nos últimos anos, grandes progressos no conhecimento relativamente ao cancro do pulmão e sistema imunitário, dando origem à imunoterapia. A imunoterapia tem como principal objetivo restaurar e aumentar a capacidade do sistema imunitário para detetar e destruir células tumorais (Disis, 2014).

O pembrolizumab é um anticorpo monoclonal anti-PDI e, de uma forma bastante interessante, permite ao sistema imunitário reconhecer e destruir células tumorais em diversas doenças oncológicas, nomeadamente no cancro do pulmão de não-pequenas células (CPNPC) (Kwok *et al.*, 2016). Este fármaco apresenta escassos anos de uso em ambiente de prática clínica normal, uma vez que foi aprovado recentemente. Apesar dos excelentes resultados em ensaios clínicos, assume particular relevância a permanente vigilância da sua eficácia e segurança depois da sua aprovação.

O presente estudo retrospectivo, realizado no Serviço de Pneumologia B – Hospital geral, CHUC, permitiu verificar se os resultados apresentados nos ensaios clínicos coincidem com os que foram apresentados no uso do mesmo fármaco, nas condições para os quais ele foi aprovado, em prática clínica, através da obtenção de informação clínica de doentes com CPNPC em estadio avançado, aos quais foi administrado pembrolizumab em segunda linha.

Tendo em conta o exposto, este trabalho está dividido em 3 secções. A primeira trata-se de uma revisão literária sobre os temas presentes nesta dissertação. Esta parte encontra-se dividida em 3 subsecções: na primeira são revistos todos os números estatísticos sobre a prevalência do cancro mundialmente, nomeadamente, o cancro do pulmão, assim como o seu impacto a nível socioeconómico, de forma a explicar a magnitude dos números e da gravidade da patologia; são também apresentadas as classificações e estadiamentos do cancro do pulmão e respetivas *guidelines* terapêuticas. Na segunda subsecção são revistos os mecanismos celulares e moleculares que justificam a utilização da imunoterapia, os seus principais objetivos, assim como as opções terapêuticas existentes atualmente. Na terceira subsecção são revistas todas as características do pembrolizumab, englobando o mecanismo de ação, perfil de segurança e eficácia, tendo sido realizada também uma revisão de todos os ensaios clínicos realizados com o pembrolizumab no CPNPC. A segunda parte consiste na apresentação do estudo retrospectivo que se realizou no CHUC e toda a metodologia utilizada no mesmo. A terceira parte consiste na apresentação, análise e discussão dos resultados que surgiram do estudo realizado e interpretação dos mesmos.

Para a realização da revisão literária deste estudo, a orientação metodológica baseou-se na pesquisa bibliográfica em livros, revistas científicas, trabalhos científicos e artigos relevantes para o tema. Por último, é de salientar que as transcrições de documentos seguem a ortografia e sintaxe da época em que foram produzidos.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA: TRATAMENTO COM PEMBROLIZUMAB DE DOENTES PREVIAMENTE TRATADOS, COM CANCRO DO PULMÃO DE NÃO-PEQUENAS CÉLULAS EM ESTADIO AVANÇADO**

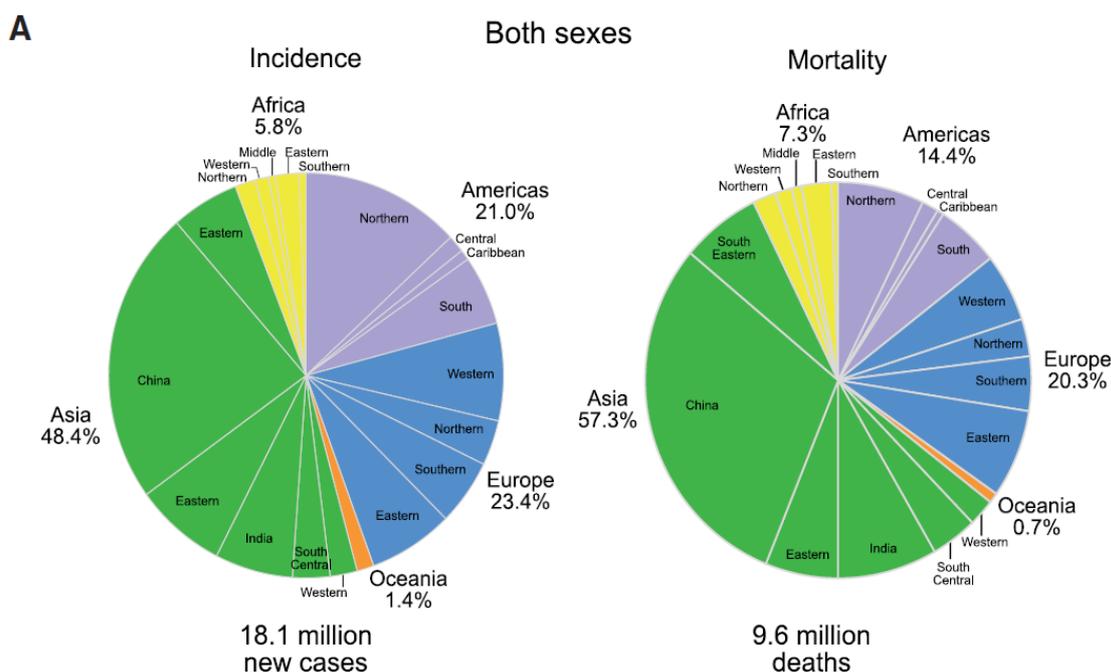
### **2.1. Cancro do Pulmão**

#### **2.1.1. Estatísticas no cancro do pulmão**

O cancro do pulmão e da mama são os mais diagnosticados e as principais causa de morte em oncologia, tanto no homem como na mulher. Existem diferenças de incidência e mortalidade entre os países mais desenvolvidos e os que estão em fase de desenvolvimento. Determinados tipos de cancro têm maior incidência em populações mais desenvolvidas e o mesmo acontece em populações de países em subdesenvolvimento, os quais apresentam um menor número de casos (57%) e mortes relacionadas com cancro (65%), apesar de terem o maior número da população mundial relativamente aos países desenvolvidos (Torre *et al.*, 2015).

Sendo uma das principais causas de morte mundialmente, o cancro do pulmão apresenta um tremendo impacto na sociedade, não só pela perda de vida humana, como também pelo impacto ao nível económico. Assim, é de extrema importância desenvolver estratégias eficazes na prevenção desta doença, combatendo a sua mortalidade e incidência.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), através da GLOBOCAN, que consiste numa base de dados que contém estimativas de incidência, mortalidade e informação de prevalência nos diferentes tipos de cancro em 184 países (Youlden, Cramb e Baade, 2008)(Cheng *et al.*, 2016), em 2012 ocorreram 14,1 milhões de novos casos de cancro e 8,2 milhões de mortes devido a esta patologia. Comparando estes resultados com a estimativa realizada em 2018 pela Organização Mundial da Saúde, observa-se um aumento substancial de aproximadamente 4 milhões de novos casos, contando com 18,1 milhões, e um aumento de 1,4 milhões de mortes relacionadas com cancro, como indica a Figura 1.



**Figura 1** - Incidência e mortalidade no cancro em 2018.

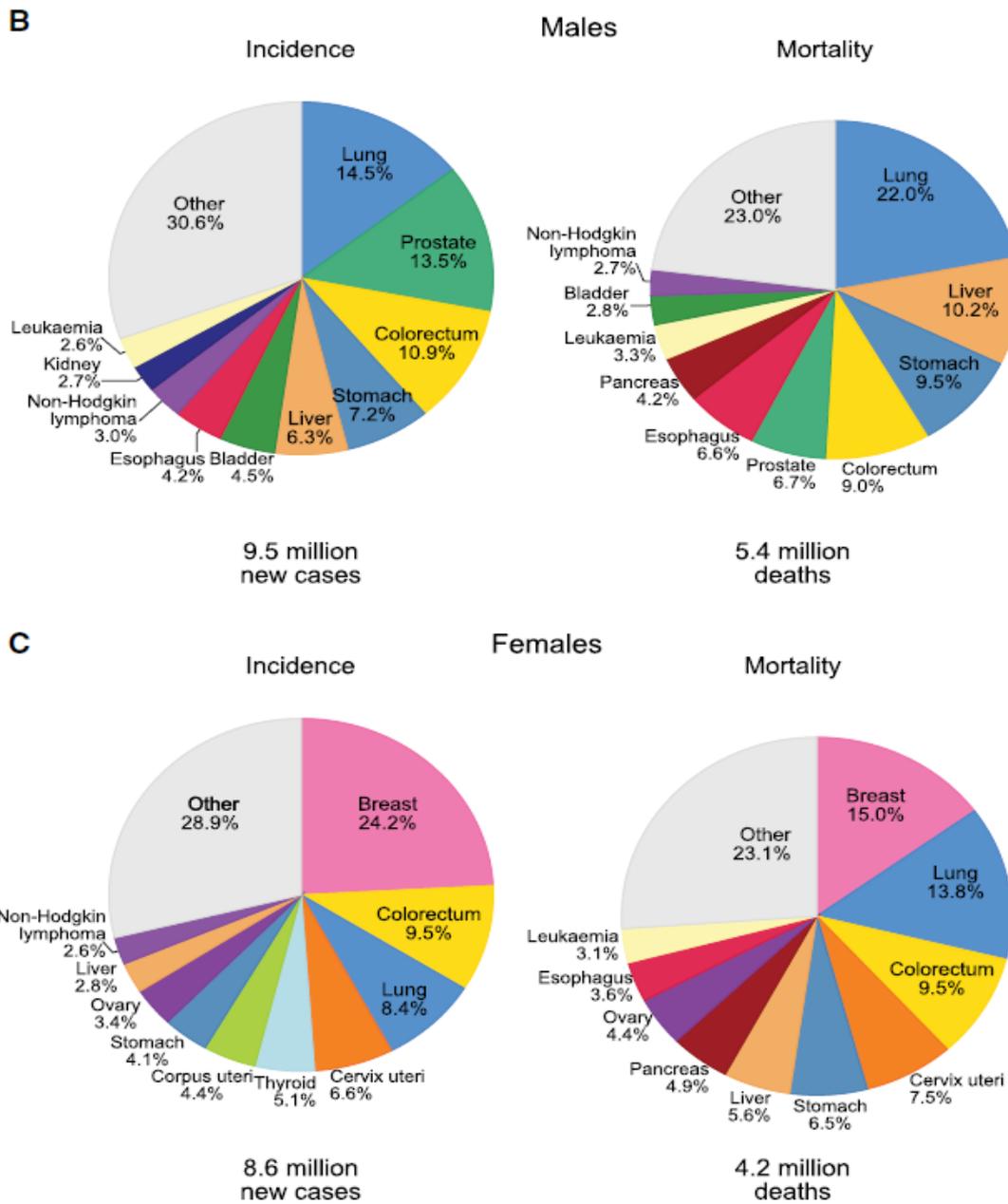
**Fonte:** Retirado de Bray et al., 2018 (com permissão).

De acordo com estes resultados, um em cada cinco homens e uma em cada seis mulheres desenvolve cancro em alguma fase da sua vida, e um em cada oito homens e uma em cada onze mulheres morre devido a esta patologia (International Agency for Research on Cancer, 2018). Em geral observa-se que em 2012 a taxa de incidência é 2 vezes maior em países desenvolvidos, enquanto a mortalidade é apenas 8 a 15% superior em países desenvolvidos. Esta diferença é observada através do *Human Development Index* (HDI) criado pelo Plano de Desenvolvimento das Nações Unidas que avalia três dimensões: esperança média de vida com qualidade, nível de educação da população, qualidade de vida e nível económico (Fidler, Bray e Soerjomataram, 2018). Já em 2018 observou-se que a incidência é 20% superior no homem e também que a mortalidade é 50% superior no homem, com 171 mortes por cada 100 000 casos na Europa do Leste. Mais especificamente no cancro do pulmão, comparando os relatórios da GLOBOCAN de 2012 e 2018 é possível verificar que em 2012 foram contabilizados 1,8 milhões de novos casos, já em 2018 foram contabilizados 2,1 milhões de novos casos, o que demonstra um ligeiro aumento de novos casos nos últimos anos. No geral, este tipo de cancro apresenta uma esperança média de vida de 5 anos após o diagnóstico, apresentando também em termos de mortalidade alterações de 2012 para 2018, com um aumento de 1,59 milhões para 1,8 milhões de mortes por cancro do pulmão.

Como referido previamente, os valores de incidência, sobrevivência e mortalidade não são iguais em todas as partes do globo. As diferenças encontradas entre países desenvolvidos e subdesenvolvidos podem ser justificadas por fatores de risco específicos de cada país e associados à cultura e estilos de vida das respetivas regiões. Existem inúmeros fatores, mas os mais frequentes são dos hábitos tabágicos ou níveis de poluição, e a mudança de tipos de cancro consoante o nível de desenvolvimento dos países, isto é, os cancros relacionados com a infeção são muito mais comuns em países em subdesenvolvimento, tendo muitos deles uma elevada taxa de mortalidade (Cheng *et al.*, 2016).

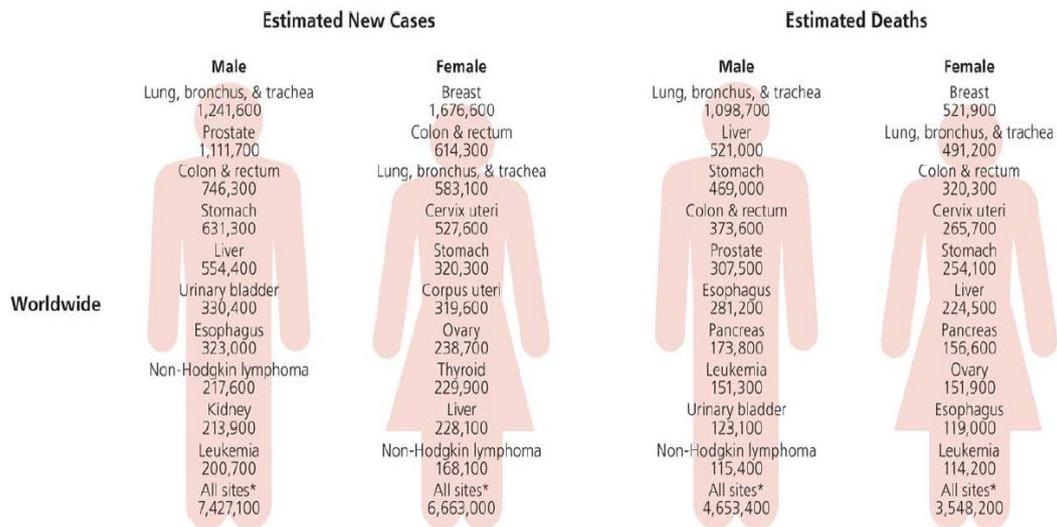
A altura do diagnóstico é uma fator importante, visto que como esta é uma patologia que se caracteriza por não apresentar quaisquer sintomas até fases mais avançadas, o seu diagnóstico é normalmente realizado já em fases muito avançadas e tardias, o que implica uma dificuldade acrescida no seu tratamento, levando a piores resultados em termos de mortalidade e sobrevivência (Cheng *et al.*, 2016). Em suma, os países que apresentaram as maiores taxas de incidência e de mortalidade foram os países muito desenvolvidos, seguidos pelos países com um HDI médio.

Estatisticamente, nos relatórios de 2012 e 2018, o cancro do pulmão tem uma incidência maior no homem, sendo o tipo de cancro mais diagnosticado e com maior mortalidade neste género. Relativamente ao género feminino o cancro do pulmão é o terceiro tipo de cancro mais diagnosticado, e o cancro da mama o primeiro, no entanto é o segundo mais mortal, como representado pelas figuras seguintes onde são apresentados os valores de incidência do cancro do pulmão no homem e na mulher em 2012 e 2018.



**Figura 2-** Incidência e mortalidade do cancro no homem e na mulher em 2018.

**Fonte:** Retirado de Bray et al., 2018 (com permissão).



**Figura 3-** Incidência e mortalidade do cancro no homem e na mulher em 2012.

**Fonte:** Retirado de Torre et al., 2015 (com permissão).

O cancro do pulmão está associado a imensos fatores de risco que podem aumentar a probabilidade de vir a contrair a doença, sendo o maior fator de risco o tabagismo. Num relatório da Organização Mundial de Saúde do ano de 2012 refere-se que, na Europa, 92% das mortes que ocorreram por cancro do pulmão, traqueia ou brônquios no homem foram atribuíveis ao tabaco, enquanto a América foi o continente que apresentou a maior proporção de mortalidade na mulher por neoplasias malignas do pulmão, traqueia e brônquios atribuível ao tabaco, com cerca de 79%, logo seguida da Europa com 62% (Saika e Machii, 2012).

Num estudo realizado em 2013 nos Estados Unidos da América, foi recolhida informação num grupo de 202 248 pessoas, 113 752 mulheres e 88 496 homens, seguidos durante 7 anos. Foram registadas 15 715 mortes, 10 743 entre os 25 e os 79 anos de idade. A taxa de risco foi apresentada para a mortalidade geral entre os 25 e os 79 anos em fumadores versus não fumadores e observou-se uma taxa de risco na mulher de 3,0 e de 2,8 no homem, isto é, o hábito tabágico está fortemente correlacionado com a morte entre as idades apresentadas, em ambos os géneros. Neste estudo demonstrou-se que, em pessoas que nunca fumaram, a probabilidade de chegarem aos 80 anos de idade é duas vezes superior comparada com a de fumadores ativos. A cessação tabágica também foi avaliada e a maneira como ela pode beneficiar a esperança de vida, tendo sido observado que em pessoas que interromperam os hábitos tabágicos ocorre um aumento da probabilidade de viverem mais 10 anos de vida quando comparados com aqueles que nunca deixaram de fumar. Para além disso, o risco de mortalidade por qualquer doença fica reduzido em 90% para quem deixa de fumar, embora

continue a ter um risco acrescido de 20% (taxa de risco de 1,2). Já os fumadores ativos apresentam uma taxa de risco acrescido de mortalidade de 200%. Com este estudo podemos então realçar a importância do tabaco na diminuição da esperança média de vida e todos os problemas que acarretam para a sociedade em geral (Jha *et al.*, 2013). Os programas de controlo do hábito tabágico de forma a prevenir o mesmo são, por isso, a principal forma de combate à mortalidade por cancro do pulmão (Cokkinides *et al.*, 2006), principalmente em países que apresentam capacidade limitada, por motivos económicos, para realizar diagnósticos de forma a detetar a doença em fases precoces, ou por não apresentarem opções terapêuticas de qualidade, como são os casos de África e América Central e do Sul (Winkler *et al.*, 2013). Está previsto que países que apresentaram diminuição de hábitos tabágicos, como por exemplo Austrália e Hong Kong, devido a programas de controlo mais apertados, apresentarão uma diminuição da incidência e consequentemente de mortalidade por cancro do pulmão nos próximos anos (Cheng *et al.*, 2016).

Esta é uma doença que tem uma prevalência enorme nos dias de hoje dando origem a inúmeros problemas sociais, principalmente ao nível económico, uma vez que todo o diagnóstico e tratamento tem custos extremamente elevados, normalmente suportados pelos sistemas de saúde dos respetivos países. A avaliação do seu impacto a nível socioeconómico assume, assim, uma importância relevante que importa ser explorada.

### **2.1.2. Impacto Socioeconómico**

A doença e as suas consequências têm um grande impacto na qualidade de vida de um indivíduo e dos que o rodeiam, assim como no sistema de saúde. Em doenças do foro oncológico esta situação assume contornos muito relevantes, pois os encargos sociais e económicos associados são enormes e a nível individual a doença acarreta complicações graves, podendo levar a sequelas não só físicas, como psicológicas e sociais. Para uma melhor compreensão das consequências socioeconómicas é necessário ter em conta o impacto na vida dos doentes e também a morte prematura que poderá advir como consequência (Luengo-Fernandez *et al.*, 2013). A medida utilizada para esta avaliação é o DALY (*Disability Adjusted Life Years*), anos de vida ajustados por incapacidade. Esta medida varia entre valores de 0 e 1, em que 1 corresponde a um ano de vida saudável perdido (WHO, 2012), ou seja esta medida fornece-nos o espaço temporal existente entre o estado de saúde atual de um indivíduo com o estado de saúde ideal do mesmo.

O estudo realizado por Jönsson e coautores (2016) que avaliou os custos e os encargos associados ao cancro na União Europeia (UE) de 1995 a 2014 demonstrou que o cancro é a

doença que apresenta mais encargos seguindo-se as doenças cardiovasculares, verificando-se um aumento de 18% para 20% dos encargos na totalidade das doenças neste período de tempo, apesar dos encargos *per capita* terem diminuído. Os autores notaram um aumento de 133% nos custos associados ao cancro entre 1995 (€ 37,7 biliões) e 2014 (€83,2 biliões); já *per capita* houve um aumento de 121% (74€ para 164€) entre esse período. Esta variação enorme de custos no tratamento do cancro, segundo os autores, pode ser justificada com o aumento de novos casos diagnosticados na UE (Torre *et al.*, 2015), com o aumento dos programas de *screening* em massa onde os rastreios em determinados tipos de cancro são um exemplo, a utilização de novos equipamentos de diagnóstico e tratamento, como são exemplos a tomografia por emissão de positrões (TEP) e os aceleradores lineares que surgiram para o tratamento e diagnóstico no período em que o estudo foi realizado, novas terapêuticas inovadoras mais caras utilizadas num maior número de doentes, acarretando, consequentemente, custos superiores.

A perda de produção devido à mortalidade prematura está intimamente relacionada com o cancro e a sua mortalidade, e é extremamente importante para a economia de um país, dado que quanto maior for o seu corpo de trabalhadores, maior será a sua produção e, consequentemente, os seus ganhos. Entre 1995 e 2014, com a diminuição da mortalidade no homem devido ao cancro e o aumento da esperança de vida, registou-se uma diminuição de 11% da perda de produção devido a mortalidade prematura (Jönsson *et al.*, 2016). Contudo, esta diminuição de perda de produção continua a ser curta quando comparada com os aumentos de 65% dos custos associados ao cancro. A melhoria deste parâmetro, isto é, a diminuição da mortalidade em idades prematuras teria um impacto benéfico relevante na sociedade e economia dos países, contudo, atualmente, esta diminuição ainda não se apresenta significativa.

## 2.1.3. Classificação do Cancro do Pulmão

**Tabela 1 – Classificação de tumores pulmonares pela Organização Mundial da Saúde (2015).**

Histologic Type and Subtypes	ICDO Code	Histologic Type and Subtypes	ICDO Code
<b>Epithelial tumors</b>		<b>Papillomas</b>	
Adenocarcinoma	8140/3	Squamous cell papilloma	8052/0
Lepidic adenocarcinoma <sup>a</sup>	8250/3 <sup>d</sup>	Exophytic	8052/0
Acinar adenocarcinoma	8551/3 <sup>d</sup>	Inverted	8053/0
Papillary adenocarcinoma	8260/3	Glandular papilloma	8260/0
Micropapillary adenocarcinoma <sup>a</sup>	8265/3	Mixed squamous and glandular papilloma	8560/0
Solid adenocarcinoma	8230/3	<b>Adenomas</b>	
Invasive mucinous adenocarcinoma <sup>a</sup>	8253/3 <sup>d</sup>	Sclerosing pneumocytoma <sup>a</sup>	8832/0
Mixed invasive mucinous and nonmucinous adenocarcinoma	8254/3 <sup>d</sup>	Alveolar adenoma	8251/0
Colloid adenocarcinoma	8480/3	Papillary adenoma	8260/0
Fetal adenocarcinoma	8333/3	Mucinous cystadenoma	8470/0
Enteric adenocarcinoma <sup>a</sup>	8144/3	Mucous gland adenoma	8480/0
Minimally invasive adenocarcinoma <sup>a</sup>		<b>Mesenchymal tumors</b>	
Nonmucinous	8256/3 <sup>d</sup>	Pulmonary hamartoma	8992/0 <sup>d</sup>
Mucinous	8257/3 <sup>d</sup>	Chondroma	9220/0
Preinvasive lesions		PEComatous tumors <sup>e</sup>	
Atypical adenomatous hyperplasia	8250/0 <sup>d</sup>	Lymphangiomyomatosis	9174/1
Adenocarcinoma in situ <sup>a</sup>		PEComa, benign <sup>e</sup>	8714/0
Nonmucinous	8250/2 <sup>d</sup>	Clear cell tumor	8005/0
Mucinous	8253/2 <sup>d</sup>	PEComa, malignant <sup>e</sup>	8714/3
Squamous cell carcinoma	8070/3	Congenital peribronchial myofibroblastic tumor	8827/1
Keratinizing squamous cell carcinoma <sup>a</sup>	8071/3	Diffuse pulmonary lymphangiomatosis	
Nonkeratinizing squamous cell carcinoma <sup>a</sup>	8072/3	Inflammatory myofibroblastic tumor	8825/1
Basaloid squamous cell carcinoma <sup>a</sup>	8083/3	Epithelioid hemangioendothelioma	9133/3
Preinvasive lesion		Pleuropulmonary blastoma	8973/3
Squamous cell carcinoma in situ	8070/2	Synovial sarcoma	9040/3
<b>Neuroendocrine tumors</b>		Pulmonary artery intimal sarcoma	9137/3
Small cell carcinoma	8041/3	Pulmonary myxoid sarcoma with <i>EWSR1-CREB1</i> translocation <sup>e</sup>	8842/3 <sup>d</sup>
Combined small cell carcinoma	8045/3	Myoepithelial tumors <sup>e</sup>	
Large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3	Myoepithelioma	8982/0
Combined large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3	Myoepithelial carcinoma	8982/3
<b>Carcinoid tumors</b>		<b>Lymphohistiocytic tumors</b>	
Typical carcinoid tumor	8240/3	Extranodal marginal zone lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	9699/3
Atypical carcinoid tumor	8249/3	Diffuse large cell lymphoma	9680/3
<b>Preinvasive lesion</b>		Lymphomatoid granulomatosis	9766/1
Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia	8040/0 <sup>d</sup>	Intravascular large B cell lymphoma <sup>a</sup>	9712/3
Large cell carcinoma	8012/3	Pulmonary Langerhans cell histiocytosis	9751/1
Adenosquamous carcinoma	8560/3	Erdheim–Chester disease	9750/1
<b>Sarcomatoid carcinomas</b>		<b>Tumors of ectopic origin</b>	
Pleomorphic carcinoma	8022/3	Germ cell tumors	
Spindle cell carcinoma	8032/3	Teratoma, mature	9080/0
Giant cell carcinoma	8031/3	Teratoma, immature	9080/1
Carcinosarcoma	8980/3	Intrapulmonary thymoma	8580/3
Pulmonary blastoma	8972/3	Melanoma	8270/3
<b>Other and Unclassified carcinomas</b>		Meningioma, NOS	9530/0
Lymphoepithelioma-like carcinoma	8082/3	<b>Metastatic tumors</b>	
NUT carcinoma <sup>a</sup>	8023/3 <sup>d</sup>	<sup>a</sup> The morphology codes are from the ICDO. <sup>2</sup> Behavior is coded /0 for benign tumors, /1 for unspecified, borderline or uncertain behavior, /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia, and /3 for malignant tumors.	
<b>Salivary gland-type tumors</b>		<sup>b</sup> The classification is modified from the previous WHO classification <sup>3</sup> taking into account changes in our understanding of these lesions.	
Mucoepidermoid carcinoma	8430/3	<sup>c</sup> This table is reproduced from the 2015 WHO Classification by Travis et al. <sup>1</sup>	
Adenoid cystic carcinoma	8200/3	<sup>d</sup> These new codes were approved by the International Agency on Cancer Research/WHO Committee for ICDO.	
Epithelial-myoepithelial carcinoma	8562/3	<sup>e</sup> New terms changed or entities added since 2004 WHO Classification. <sup>3</sup>	
Pleomorphic adenoma	8940/0	LCNEC, large cell neuroendocrine carcinoma, WHO, World Health Organization; ICDO International Classification of Diseases for Oncology.	

(Continued)

**Fonte:** Retirada de Travis et al., 2015 (com permissão).

O cancro do pulmão apresenta uma complexidade biológica elevada que está inerente aos subtipos histológicos que este apresenta. Esta doença apresenta diversos grupos histológicos com mecanismos biológicos diferentes, o que implica uma abordagem terapêutica diferente para cada um deles. A classificação é, assim, de extrema importância, não só para o próprio prognóstico da doença, uma vez que este difere consoante o subtipo, como para a abordagem terapêutica a apresentar ao doente.

A última classificação para os tumores pulmonares foi realizada pela Organização Mundial (OMS) da Saúde em 2015 (Tabela 1). Esta reviu e alterou, em certos itens, a classificação realizada em 2004 (Travis *et al.*, 2015). Segundo a classificação de 2015, o cancro do pulmão é dividido em dois grandes grupos histológicos: cancro do pulmão de não-pequenas células (CPNPC), que constitui o grupo histológico mais comum na doença com cerca de 85% dos casos, e o cancro do pulmão de pequenas células (CPPC) que representa os restantes 15% (Zugazagoitia *et al.*, 2014).

Segundo a OMS e Associação internacional para o estudo do cancro do pulmão, o CPNPC está subdividido em vários subtipos histológicos, sendo os mais comuns o adenocarcinoma com 40% dos casos de cancro do pulmão, o carcinoma de células escamosas com 25% dos casos e o carcinoma de células gigantes com 10% dos casos (Travis *et al.*, 2015).

Na transição da classificação de 2004 para 2015, o adenocarcinoma foi o subtipo histológico de cancro do pulmão que mais alterações sofreu. Até 2015, a classificação patológica deste subtipo histológico foi um desafio para os profissionais de saúde devido às enormes diferenças histológicas e clínicas inerentes a este subtipo. Segundo a revisão da nova classificação realizada por Jon Zugazagoitia e coautores (2014), esta classificação permitiu a subdivisão do adenocarcinoma em vários outros subtipos de forma a tornar os grupos histológicos mais homogêneos em termos morfológicos, clínicos e com melhores relações biológicas comparativamente à antiga classificação de 2004. Segundo os autores, 90% dos subtipos de adenocarcinoma invasivo entrava na categoria “mixed subtype” que trazia muita pouca informação e pouca capacidade clínica de resposta a esta categoria. De forma a combater esta falha, a nova classificação descontinua o “mixed subtype adenocarcinoma”, uma vez que houve um enorme avanço na classificação histológica devido aos novos métodos imunohistoquímicos que foram surgindo ao longo dos últimos anos e que permitem a estimativa quantitativa dos diferentes subtipos presentes nesta categoria. Assim, surgiram duas novas categorias: adenocarcinoma *in situ* (AIS), com diâmetro inferior a 3 cm de padrão lipídico, que apresenta características poucas invasivas; e o adenocarcinoma minimamente invasivo (AMI), com diâmetro superior a 3 cm e com componente invasiva inferior a 5 mm (Inamura, 2017). Com isto, as categorias de adenocarcinoma bronquíolo alveolar mucinoso e

não mucinoso deixaram de ser utilizadas e, segundo a nova classificação, surgiram os subtipos pertencentes ao subtipo maior de lesões pré-invasivas: AIS mucinoso e não mucinosos, AMI mucinoso e não mucinosos e adenocarcinoma mucinoso invasivo. Estes novos subtipos juntaram-se à hiperplasia adenomatosa atípica, como as lesões pré-invasivas considerados pela nova classificação. A Tabela 2 apresenta as diferenças presentes entre as duas classificações de adenocarcinomas (2004 e 2015).

**Tabela 2 - Comparação da patologia do adenocarcinoma pulmonar de 2004 e 2015.**

2004 WHO classification
Mixed subtype
Acinar
Papillary
BAC
Non mucinous
Mucinous
Mixed
Solid adenocarcinoma
Colloid
Fetal
Mucinous cystadenocarcinoma
Signet-ring
Clear-cell
Major changes in the new IASLC/ATS/ERS classification
Discontinuation of the term BAC
Discontinuation of the mixed subtype
Comprehensive pathologic subtyping in 5% increments and classification of adenocarcinomas according to the predominant subtype
Introduction of AIS and MIA as new entities
Introduction of micropapillary adenocarcinoma as a predominant subtype
Introduction of lepidic predominant adenocarcinoma and lepidic growth as new terminologies
Exclusion of signet-ring and clear cell adenocarcinomas
IASLC/ATS/ERS classification
Pre-invasive lesions
Atypical adenomatous hyperplasia
AIS
Non-mucinous
Mucinous
Mixed
MIA
Non-mucinous
Mucinous
Mixed
Invasive adenocarcinomas
Lepidic predominant
Acinar predominant
Papillary predominant
Micropapillary predominant
Solid predominant with mucin production
Variants of invasive adenocarcinomas
IMA
Colloid
Fetal
Enteric

**Fonte:** Retirado de Zugazagoitia *et al.*, 2014 (com permissão).

O segundo maior grupo histológico é o CPPC, englobado no grupo dos tumores neuroendócrinos. Estreitamente relacionado com o hábito tabágico, com 95% dos casos detetados em indivíduos fumadores ou ex-fumadores, este representa 15% de todos os casos de cancro do pulmão (Travis *et al.*, 2015) e, apesar de ser menos comum que o CPNPC, tem geralmente pior prognóstico apresentando, em 90% dos casos, metastização local ou distante.

Por isso, a sobrevivência global a cinco anos deste grupo é de cerca de 5%, muito inferior ao CPNPC, que apresenta nos seus casos mais favoráveis 70% a 90% de sobrevivência global a cinco anos (Knight *et al.*, 2017).

Como foi referido anteriormente, a classificação de 2015 apresentou diferenças importantes relativamente ao que foi publicado em 2004. William D. Travis refere, na sua revisão à nova classificação de 2015, que as principais mudanças relativamente à classificação anterior englobam o uso da imunohistoquímica para praticamente todas as classificações de cancro do pulmão, incluindo em tumores ressecados. Ressalva, ainda, uma maior importância aos estudos genéticos em doentes e avanços nos estudos moleculares que permitirão melhorar e aumentar as escolhas terapêuticas, principalmente em estadios avançados. Refere também uma nova classificação para pequenas biópsias e citologia como foi proposto em 2011 na classificação de adenocarcinoma pulmonar, realizada pela Associação internacional para o estudo do cancro do pulmão em conjunto com a Sociedade Torácica Americana e Sociedade Internacional Multidisciplinar Respiratória Europeia, assim como, uma nova abordagem na classificação do adenocarcinoma que foi revista por estas entidade em 2011 (Travis *et al.*, 2011). Adicionalmente, refere uma restrição do diagnóstico do carcinoma de células gigantes apenas para tumores ressecados que não tenham diferenciação imunohistoquímica ou morfológica suficiente, reformulando todos os que tenham diferentes categorias e ainda a reclassificação do carcinoma de células escamosas em queratinizante, não queratinizante ou de subtipo basilóide, bem como agrupa todos os tumores neuroendócrinos numa só categoria, onde se inclui o CPPC.

Todas estas mudanças na classificação do cancro do pulmão só foram possíveis graças aos avanços na imunohistoquímica, que até 2004 só permitiam a classificação do carcinoma de células gigantes, e atualmente permitem a classificação da maior parte dos principais subtipos de cancro do pulmão, incluindo todos os subtipos de adenocarcinoma, o que permitiu o surgimento de diferentes terapêuticas específicas para cada subtipo, em grande parte no CPNPC.

Para além da imunohistoquímica, um dos grandes avanços, desde a classificação de 2004, foi a personalização da medicina ou individualização da medicina, isto é, os avanços atingidos na área bioquímica, molecular e genética permitiram conhecer os perfis genéticos e as diferenças presentes em cada indivíduo, não só na resposta ao tratamento, como também nos mecanismos de doença. Assim, existem evidências de que o tratamento, monitorização e prevenção de determinada doença, quando personalizados de acordo com os perfis bioquímico, genético, fisiológico, exposição ambiental e comportamental intrínsecos a cada indivíduo, fornecem melhores e mais adequadas respostas no combate a determinada doença

(Goetz e Schork, 2018), nomeadamente em oncologia.

Estes avanços nos perfis genéticos permitiram adotar decisões terapêuticas baseadas no subtipo histológico e características genéticas do tumor do doente em particular (Travis *et al.*, 2015), permitindo simultaneamente, identificar novos alvos terapêuticos e, consequentemente, aumentar as opções terapêuticas, extremamente reduzidas até à data.

#### **2.1.4. Estadiamento do Cancro do Pulmão**

No diagnóstico do cancro do pulmão o estadiamento também apresenta uma importância fundamental para tomadas de decisão por parte do clínico. Para que os estudos do cancro do pulmão pudessem ser realizados por toda a comunidade clínica e científica de uma forma padronizada e uniforme, a criação de uma estrutura padronizada que defina a extensão do tumor é fundamental. O estadiamento surge, então, como a estrutura que permite a uniformização da informação relativa à extensão do tumor no cancro do pulmão. Atualmente, o sistema de estadiamento utilizado para o CPNPC é a 8ª edição do estadiamento TNM criado pelo Projeto de estadiamento do cancro do pulmão da Associação Internacional para o Estudo do Cancro do Pulmão. O estadiamento TNM, para além do cancro do pulmão, é utilizado na maioria dos outros tipos de cancro.

A letra T descreve a extensão do tumor primário, medindo a maior dimensão do tumor primário através do método de tomografia axial computadorizada (TAC), e ainda outros descritores de invasão de estruturas adjacentes. A letra N descreve o envolvimento e localização de nódulos linfáticos, que varia desde nenhum nódulo linfático envolvido (N0) a metástases em nódulos contralaterais mediastínicos/hilares ou nódulos supraclaviculares (N3). A letra M representa a existência de metástases distantes, que varia de nenhuma metástase presente (M0) até múltiplas metástases extratorácicas num ou mais órgãos (M1c) (Detterbeck *et al.*, 2016) (Tabela 3).

**Tabela 3 - Classificação dos descritores TNM.**

<b>T (Primary Tumor)</b>		<b>Label</b>
T0	No primary tumor	
Tis	Carcinoma in situ (Squamous or Adenocarcinoma)	Tis
T1	Tumor ≤3 cm,	
T1a(mi)	Minimally Invasive Adenocarcinoma	T1a(mi)
T1a	Superficial spreading tumor in central airways <sup>a</sup>	T1a <sub>SS</sub>
T1a	Tumor ≤1 cm	T1a <sub>≤1</sub>
T1b	Tumor >1 but ≤2 cm	T1b <sub>&gt;1-2</sub>
T1c	Tumor >2 but ≤3 cm	T1c <sub>&gt;2-3</sub>
T2	Tumor >3 but ≤5 cm or tumor involving: visceral pleura <sup>b</sup> , main bronchus (not carina), atelectasis to hilum <sup>b</sup>	T2 <sub>Visc Pl</sub> T2 <sub>Centr</sub>
T2a	Tumor >3 but ≤4 cm	T2a <sub>&gt;3-4</sub>
T2b	Tumor >4 but ≤5 cm	T2b <sub>&gt;4-5</sub>
T3	Tumor >5 but ≤7 cm or invading chest wall, pericardium, phrenic nerve or separate tumor nodule(s) in the same lobe	T3 <sub>&gt;5-7</sub> T3 <sub>Inv</sub> T3 <sub>Satell</sub>
T4	Tumor >7 cm or tumor invading: mediastinum, diaphragm, heart, great vessels, recurrent laryngeal nerve, carina, trachea, esophagus, spine; or tumor nodule(s) in a different ipsilateral lobe	T4 <sub>&gt;7</sub> T4 <sub>Inv</sub> T4 <sub>Ipsi Nod</sub>
<b>N (Regional Lymph Nodes)</b>		
N0	No regional node metastasis	
N1	Metastasis in ipsilateral pulmonary or hilar nodes	
N2	Metastasis in ipsilateral mediastinal/subcarinal nodes	
N3	Metastasis in contralateral mediastinal/hilar, or supraclavicular nodes	
<b>M (Distant Metastasis)</b>		
M0	No distant metastasis	
M1a	Malignant pleural/pericardial effusion <sup>c</sup> or pleural /pericardial nodules or separate tumor nodule(s) in a contralateral lobe;	M1a <sub>Pl Dissem</sub> M1a <sub>Contr Nod</sub>
M1b	Single extrathoracic metastasis	M1b <sub>Single</sub>
M1c	Multiple extrathoracic metastases (1 or >1 organ)	M1c <sub>Multi</sub>

**Fonte:** Retirado de Detterbeck *et al.*, 2017 (com permissão).

As combinações dos descritores T, N e M dão origem aos grupos de estadiamento, que variam do estadio IA a IVB. De seguida, na Tabela 4, apresenta-se num quadro adotado da 8ª edição da classificação do estadiamento no cancro do pulmão e o enquadramento da codificação TNM com o estadiamento correspondente.

**Tabela 4 - Estadiamento da 8ª edição TNM.**

T/M	Label	N0	N1	N2	N3
T1	T1a $\leq 1$	IA1	IIB	IIIA	IIIB
	T1b $>1-2$	IA2	IIB	IIIA	IIIB
	T1c $>2-3$	IA3	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2a <i>Cent, Yisc Pl</i>	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2a $>3-4$	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2b $>4-5$	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	T3 $>5-7$	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 <i>Inv</i>	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 <i>Satell</i>	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4	T4 $>7$	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T4 <i>Inv</i>	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T4 <i>Ipsi Nod</i>	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1	M1a <i>Contr Nod</i>	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1a <i>Pl Dissem</i>	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b <i>Single</i>	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c <i>Multi</i>	IVB	IVB	IVB	IVB

**Fonte:** Retirado de Detterbeck *et al.*, 2017 (com permissão).

Segundo Peter Goldstraw (2009), a sobrevivência global a cinco anos varia consoante o estadio. O autor refere que doentes com estadio IA1 têm uma sobrevivência global a 5 anos de cerca de 90%, enquanto doentes em estadios IVB apresentam uma sobrevivência global a cinco anos de 10%. Isto significa que o estadiamento pode funcionar como um fator de prognóstico importante, uma vez que existe uma relação estatística significativa que indica que a sobrevivência se correlaciona com o estadio que o doente apresenta.

Assim, podemos concluir que a classificação e estadiamento de um doente tem uma importância enorme, não só em termos de diagnóstico como de prognóstico, fornecendo informação útil para a escolha da melhor terapêutica por parte do clínico e para o controlo das expectativas do doente relativamente ao seu problema de saúde.

## 2.1.5. Cancro do Pulmão de não-pequenas células (CPNPC)

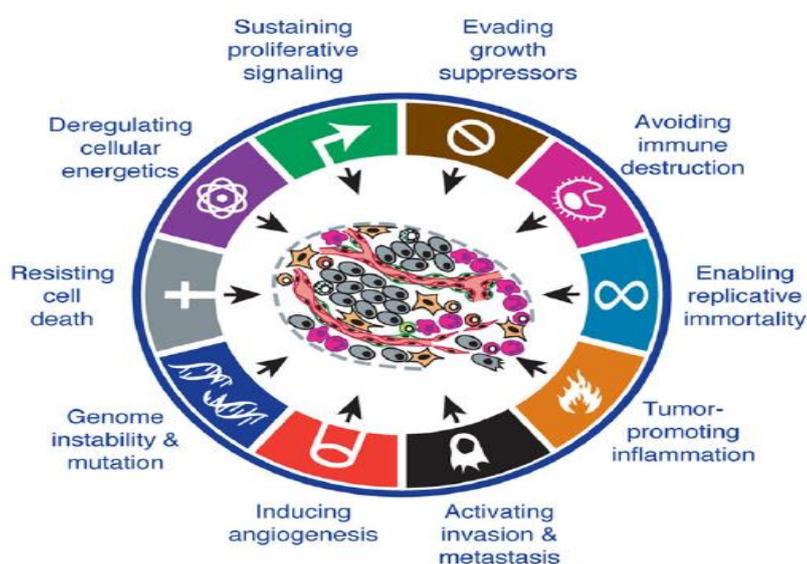
### 2.1.5.1. Biologia e mecanismos imunes envolvidos

O cancro do pulmão, principalmente o CPNPC, sendo uma das principais causas de morte a nível mundial, tem sido estudado intensamente. Ao longo dos anos as descobertas e conhecimento sobre a sua biologia, interações moleculares e do como as suas características variam perante diferentes exposições a determinados fatores têm sido exponenciais.

Segundo Ian A. Cree (2011), células tumorais são células modificadas que sofreram uma séria de transformações originando o aparecimento de tumores. Na maior parte das vezes

estas transformações ocorrem por exposição a diversos fatores externos que despoletam a carcinogênese. Apesar de existir suscetibilidade genética para o desenvolvimento de cancro, o hábito tabágico é o maior fator de risco para o desenvolvimento de cancro do pulmão, uma vez que o tabaco provoca lesões tecidulares que induzem alterações genéticas e epigenéticas. Se essas mudanças e lesões persistirem por longos períodos de tempo, ocorre a ativação de ciclos celulares incorretos e alterações de funções celulares básicas, aumentando a disposição para alterações como o aumento da angiogênese e a invasão celular (Roy S. Herbs, 2006).

De acordo com Hanahan e Weinberg (2011) existem dez características ou “Hallmarks”, em células cancerígenas: sinalização proliferativa sustentada, evicção de supressores de crescimento, aumento da capacidade de invasão e metastização, indução de angiogênese, capacidade de replicação imortal e resistência à morte celular, desregulação energética celular, capacidade de evasão ao sistema imunológico, inflamação promovida pelo tumor e a instabilidade genómica e mutacional. Estas características, apresentadas na figura seguinte, são influenciadas e originadas pelas alterações genéticas que estão presentes em células cancerígenas. Assim, torna-se essencial perceber a biologia e mecanismos envolvidos no CPNPC para se conseguirem introduzir novas opções terapêuticas válidas para esta patologia.



**Figura 4** - Os dez Hallmarks presentes em células tumorais.

**Fonte:** Retirado de Hanahan e Weinberg, 2011 (com permissão).

O CPNPC é considerado uma doença heterogênea uma vez que é composto por várias subpopulações de células com perfis moleculares distintos, dando origem a uma grande heterogeneidade tumoral. A heterogeneidade está muito relacionada com as alterações genéticas ou mutações genéticas, nomeadamente em proto-oncogenes com ativação de

oncogenes, isto é, genes que apresentam mutações. Neste subtipo de cancro pulmonar a carga de mutação tumoral é maior, especialmente em fumadores, o que engloba a maior parte dos doentes (Herbst, Morgensztern e Boshoff, 2018). Estas mutações são maioritariamente encontradas em metástases e não nas lesões primárias do pulmão (Robinson et al., 2017).

Esta patologia alberga uma grande diversidade genética entre indivíduos. O conhecimento da sua biologia molecular tem sido revolucionado pelo aparecimento de novas tecnologias de sequenciação de próxima geração, que fornece informação sobre alterações somáticas e genomas ou exomas de cancro. Apesar destes estudos e avanços tecnológicos, o desafio permanece em identificar mutações biologicamente relevantes no meio de todas as mutações passageiras que ocorrem no nosso organismo diariamente (Cooper et al., 2013). Para Wendy Cooper (2013) a escassez de alta frequência de mutações recorrentes realça a heterogeneidade e complexidade da biologia molecular no cancro do pulmão, tornando-se uma patologia para a qual, ainda nos dias de hoje, existem poucas opções terapêuticas e, na maior parte dos casos, dificilmente o prognóstico clínico é bom.

Mutações genéticas influenciam muito o microambiente tumoral, isto é, tudo o que envolve a célula tumoral quer ao nível extracelular quer ao nível intracelular, o que indica que as alterações genéticas determinam as capacidades da célula tumoral e a composição do respetivo microambiente. Normalmente, em lesões primárias existe a perda de capacidade heterozigótica em várias regiões dos cromossomas responsáveis pela expressão de genes supressores tumorais e a ativação da transcrição de proto-oncogenes como o *epidermal growth factor receptor (EGFR)* e *Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS)* (Roy S. Herbs, 2006). Em termos gerais, as principais alterações que levam a oncogénese no cancro do pulmão envolvem processos de metilação de regiões promotoras de genes, mutações de genes supressores tumorais como o *p53*, mutações no *EGFR*, perda de capacidade heterozigótica e instabilidade microsatélite celular (Roy S. Herbs, 2006), entre outras alterações.

As alterações genéticas mais comuns no CPNPC são nos genes *KRAS* e *EGFR*, em cerca de 30 e 40% dos adenocarcinomas, respetivamente. O *KRAS* é uma proteína que tem um papel fundamental na cascata de sinalização *Rat Sarcoma virus (RAS)/ Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK)* para a transdução do sinal e é responsável pela regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Já o *EGFR* codifica a tirosina cinase transmembranar responsável pela ativação do domínio tirosina cinase e regula a proliferação celular, neovascularização, capacidade de invasão e metastização (Cooper et al., 2013).

Ao longo dos anos foram descobertas outras alterações genéticas que estão relacionadas com o CPNPC, nomeadamente o rearranjo na *Anaplastic lymphoma kinase (ALK)*, recetor da tirosina cinase do gene *ROSI* e a expressão do *PD-LI* nas membranas celulares das células

tumorais, todas com efeito no desenvolvimento e progressão da doença, pelo que a descoberta destas alterações permitiu identificar novos alvos terapêuticos e, conseqüentemente, novos fármacos para o combate a esta doença.

#### 2.1.5.2. *Guidelines Terapêuticas*

Os sintomas associados ao cancro do pulmão são semelhantes a muitos sintomas associados a inúmeras outras doenças e surgem muitas vezes em fases tardias. Como consequência, os doentes que são diagnosticados em fases precoces são uma minoria. A deteção precoce é importante e pode mudar o prognóstico desta doença, dando oportunidade para a utilização de opções terapêuticas que apresentem melhores resultados em fases precoces.

Antes de iniciar qualquer tratamento há que classificar e estadiar corretamente o carcinoma, principalmente em fases tardias da doença, como estadios IV, uma vez que as opções terapêuticas existentes estão intimamente relacionadas com a histologia e biologia molecular do tumor. Para isso, o diagnóstico e estadiamento são fundamentais.

Testes complementares de diagnóstico como a TAC, PET e Raio-X são importantes na descoberta da doença. Posteriormente, o diagnóstico completo e correto é realizado através da coleção de material tumoral, maioritariamente por broncofibroscopia (BF), muitas vezes acompanhada por ultrassonografia endobrônquica para avaliar as regiões linfáticas (EBUS) (Postmus *et al.*, 2017). Esta técnica é a mais utilizada, não só porque mais de 70% dos carcinomas são visíveis por BF, mas também por esta apresentar uma rentabilidade elevada, uma vez que quando combinada com 3 a 5 biópsias com citologia do aspirado e/ou escovado brônquico, a rentabilidade ultrapassa os 90% e as taxas de complicações e mortalidade são baixas (0,12% e 0,04%, respetivamente) (Araújo *et al.*, 2012). A biópsia brônquica é também uma técnica muito utilizada e com elevada rentabilidade, mas por ser mais invasiva acarreta um maior número de complicações associadas. Após a recolha da amostra tumoral, a patologia clínica procede à classificação de acordo com as *guidelines* apresentadas pela OMS, em conjunto com o estadiamento realizado de acordo com 8ª edição TNM, fornecendo informação detalhada e fundamental para o conhecimento do estado da doença e para a escolha terapêutica por parte do clínico. De reforçar que esta classificação e estadiamento tem especial importância na doença em estadios avançados, uma vez que as opções terapêuticas existentes são selecionadas consoante a classificação e estadiamento fornecidos.

- **Guidelines e recomendações para estadios precoces**

O tratamento no cancro do pulmão tem sofrido alterações e melhoramentos ao longo dos anos, consoante as descobertas científicas realizadas. Existem várias *guidelines* que fornecem recomendações sustentadas cientificamente, de forma a promover uma decisão equilibrada e cientificamente robusta por parte do clínico. As *guidelines* apresentadas pela Sociedade Europeia de Oncologia Médica (ESMO), visto serem fornecidas pela principal organização profissional de oncologia médica, apresentam validade científica robusta e de elevada qualidade, pelo que são muito utilizadas por clínicos para a escolha de opções terapêuticas.

Em estadios iniciais de CPNPC é recomendada a cirurgia de remoção tumoral, mais especificamente a lobectomia com disseção dos nódulos linfáticos. Este é o *standard of care* para doentes em estadios I e II de CPNPC (Postmus *et al.*, 2017), que apresentam taxas de sobrevivência global a 5 anos que variam de 69 a 89% em estadio Ia, 52 a 75% em estadio Ib, 45 a 52% no IIa e 33% em estadio IIb (Crinò *et al.*, 2010). Apesar de ser um procedimento extremamente invasivo, que pode ter consequências graves para o doente, as taxas de mortalidade são relativamente baixas variando entre 1 e 7,6%, mas quando realizados em centros de referência, este parâmetro diminui para menos de 2% (Crinò *et al.*, 2010). Apesar de nestes casos a doença se apresentar em estadios precoces, muitos dos doentes podem apresentar várias comorbidades e problemas de saúde associados que podem influenciar o decorrer e o resultado da cirurgia; quando o doente manifesta expressa vontade de não querer correr o risco da realização da cirurgia, a radioterapia é a opção terapêutica indicada.

Doentes que apresentem estadio I recomenda-se a radioterapia estereotáxica ablativa (SABR) numa dosagem superior ou igual a 100 Gy. Este tipo de radioterapia está associado a um baixo risco de toxicidade para doentes com doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) e idosos, pelo que estes doentes são bons candidatos para este tratamento, caso não se reúnam as condições ideais para a cirurgia. Se existir progressão, a cirurgia é uma opção, mas acarreta maior dificuldade e mais riscos para o doente. Um esquema de radioterapia mais radical e mais acelerado é recomendado para tumores com diâmetro superior a 5 cm (Postmus *et al.*, 2017).

Desde 1990, visando obter-se uma melhor resposta à cirurgia, tem-se estudado os benefícios da quimioterapia adjuvante. Várias meta-análises foram realizadas desde os anos 90 que demonstraram que a taxa de sobrevivência global a 5 anos em doentes em estadios II e III melhorou 4 a 5 pontos percentuais (Cortés, Urquizu e Cubero, 2015). Assim, a quimioterapia adjuvante é recomendada para doentes com tumores ressecados de estadios II e III, ou para

doentes com estadios Ib com tumor de diâmetro inferior a 4 cm. A combinação realizada neste tratamento é maioritariamente a combinação de cisplatina, até uma dosagem máxima de 300 mg/m<sup>2</sup>, com vinorelbina.

- **Guidelines para estadios localmente avançados (estadios III)**

O CPNPC localmente avançado, ou de estadio III, apresenta um determinado número de características que influenciam a abordagem do seu tratamento. Neste estadio referem-se situações clínicas em que as características da doença determinam que esta é ainda operável. Nestes casos incluem-se os doentes que apresentam um N2 e os restantes nódulos sujeitos a biópsia não apresentam doença ou são benignos, ou apresentam T4N0 sem doença nodular provada por métodos invasivos (Postmus *et al.*, 2017).

No caso de o doente apresentar N2 a quimioterapia adjuvante é aconselhada. Quando o doente não apresenta nenhuma destas características em estadio III, este não é operável, mesmo após um tratamento de indução a resseção completa. Neste caso duas abordagens são recomendadas: a abordagem sequencial ou concomitante. Na abordagem sequencial, o clínico opta por uma primeira fase de quimioterapia à base de platínios, preferencialmente cisplatina, sendo posteriormente realizada radioterapia definitiva. No caso da abordagem concomitante, o clínico opta pela realização de até 4 ciclos de quimioterapia concomitantemente com a radioterapia. A abordagem concomitante é a mais utilizada e recomendada, visto apresentar melhores resultados, apesar de alguma toxicidade. Assim, para estadios IIIA ou IIIB é recomendada a quimiorradioterapia concomitantemente como tratamento de primeira linha (Postmus *et al.*, 2017).

- **Guidelines para estadios avançados (estadio IV)**

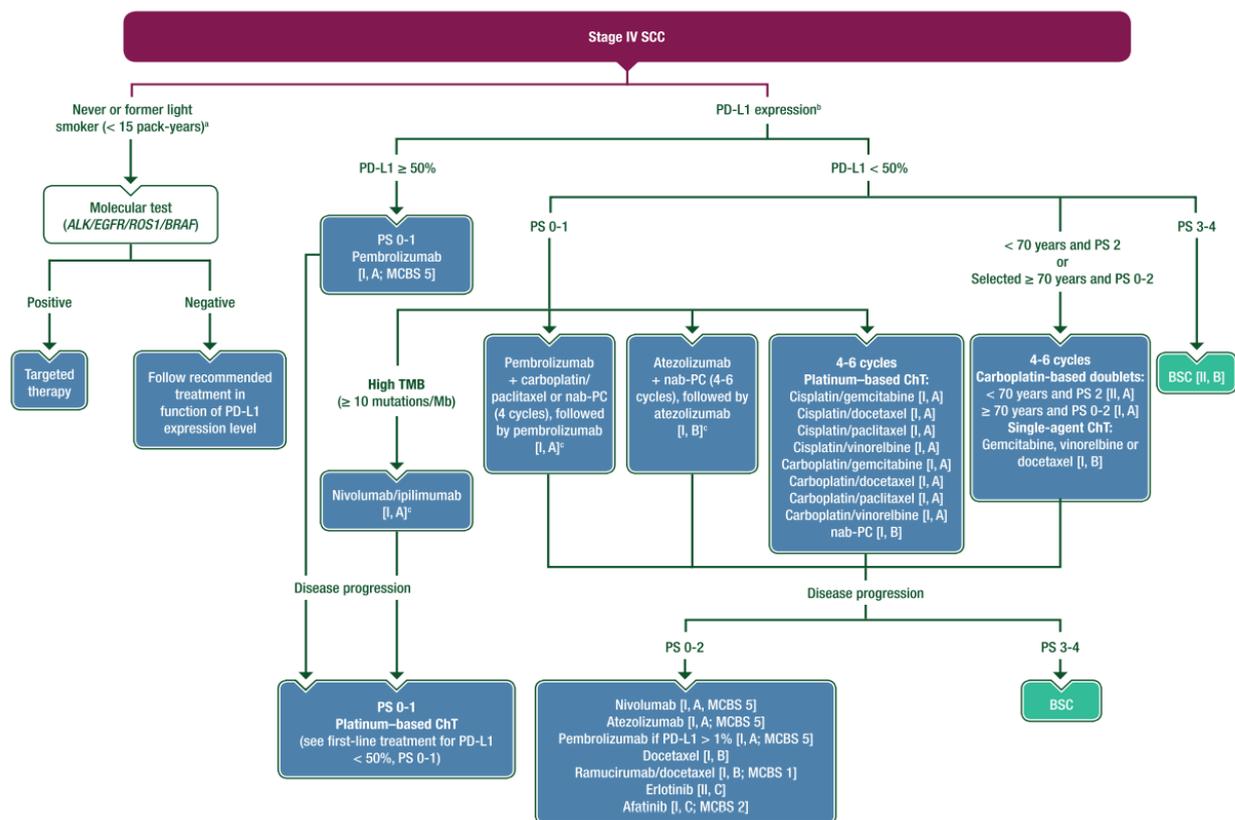
O cancro do pulmão é normalmente diagnosticado em fases tardias do seu desenvolvimento, o que implica que a maior parte dos doentes se encontra em fases avançadas da doença, nomeadamente com metastização e sem indicação para cirurgia. Em fases avançadas, diversos fatores influenciarão as opções terapêuticas, como o estado geral do doente e as suas comorbidades, uma vez que apresentam uma maior probabilidade de agravamento. A análise do *performance status* (PS) assume alguma importância nestes casos porque analisa o estado geral do doente, isto é, analisa as capacidades físicas e mentais do doente, sendo o resultado apresentado numa escala, desenvolvida pelo *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG), que varia de 0 a 5, onde 0 representa um estado de total capacidade

sem quaisquer restrições do doente, e o 5 representa a morte.

Depois de ser analisado o estado geral do doente e realizado o diagnóstico morfológico, é fundamental o diagnóstico molecular, que identifica variações moleculares individuais indicativas de qual a melhor estratégia terapêutica a ser adotada. Atualmente, os testes moleculares são direcionados para a detecção de alterações genéticas e para o teste de marcadores terapêuticos imuno-oncológicos. Nos últimos anos, a descoberta de novos alvos terapêuticos em estadios avançados tem aumentado, devido aos grandes avanços na biologia molecular, tendo sido demonstrado que várias alterações genéticas apresentam implicações no desenvolvimento desta doença (Roy S. Herbs, 2006).

Nas mais recentes *guidelines* da ESMO (Planchard *et al.*, 2018), o tratamento e seguimento do doentes com CPNPC em estadios avançados assenta no diagnóstico molecular, especialmente dirigido para 5 alvos moleculares: mutação no complexo EGFR, rearranjos ALK, rearranjo ROSI, mutações no gene BRAF e a expressão do PD-L1. Estas alterações são importantes para decidir terapêutica, pois os inibidores da cinase de resíduos tirosina têm ação terapêutica com alterações ou no EGFR, ou no ALK ou no ROSI; já em mutações no BRAF são recomendado inibidores BRAF ou inibidores da *Mitogen-activated protein kinase* (MEK), no caso da expressão de PD-L1 apresentar uma percentagem de *tumor proportion score* (TPS) (presença da proteína PD-L1 na membrana de células tumorais) superior a 50% é indicativo da utilização do pembrolizumab como primeira linha para o tratamento de estadios IV.

Resumindo, o tratamento de estadios avançados depende de inúmeros fatores físicos e biológicos do doente, estado geral, comorbidades e diagnóstico molecular, os quais dão origem a diferentes orientações que conjugam estes três fatores, sendo as decisões tomadas em equipas multidisciplinares. A Figura 1, retirada das *guidelines* clínicas da ESMO para o CPNPC em estadios avançados de 2018 (Planchard *et al.*, 2018), demonstra as diferentes recomendações para 1ª linha de tratamento.



**Figura 5** - Algoritmo de tratamento no CPNPC em estadio IV.

**Fonte:** Retirado de Planchard et al., 2018 (com permissão).

No caso da 1ª linha não se mostrar eficiente, uma vez que o doente apresenta uma progressão da doença ou um deterioramento clínico acentuado, o médico avança para as segundas linhas de tratamento e, subsequentemente, para a terceira, caso a segunda não apresente benefícios terapêuticos.

O tratamento existente para o cancro do pulmão tem evoluído a grande ritmo nos últimos anos, com resultados terapêuticos associados que num passado próximo não eram esperados. No futuro, a terapêutica oncológica ambiciosa tornar as doenças oncológicas em doenças crónicas, perspetivando manter a qualidade de vida e a sobrevivência global muito superiores às alcançadas atualmente. Neste sentido, a terapêutica individualizada assume particular relevância, sendo o mais direcionada possível para o doente em particular. A imunoterapia veio potenciar este racional, alterando por completo o tratamento do CPNPC.

## **2.2. Imunoterapia no Cancro**

### **2.2.1. Conceitos gerais**

O conceito do envolvimento da imunologia no processo da doença e da cura não é contemporâneo. O desenvolvimento da vacina da varíola, no século XVII, veio enfatizar o envolvimento do sistema imunitário (SI) no combate às mais variadas doenças. No ano de 1909, Paul Erlich desenvolveu a hipótese de que o tumor seria controlado pelo SI (Abbott e Ustoyev, 2019). Posteriormente, em 1957, Thomas e Burnett introduziram o conceito da vigilância imunológica, destacando o papel das células do SI, nomeadamente os linfócitos, na identificação e eliminação de células que sofreram mutações (Abbott e Ustoyev, 2019). Esta hipótese foi suportada na altura por vários estudos que apresentaram evidências científicas de que as células tumorais apresentam antigénios que as diferenciam das normais (Boyse, 1964). Os antigénios são proteínas celulares normais que em caso de células geneticamente alteradas são expressas anormalmente (Finn, 2012). Em 2001, Shankaran e co-autores (2001), observaram que o SI controla não só a quantidade tumoral mas também a qualidade tumoral. Assim, a hipótese de Thomas e Burnett é substituída pela hipótese da imunoedição tumoral.

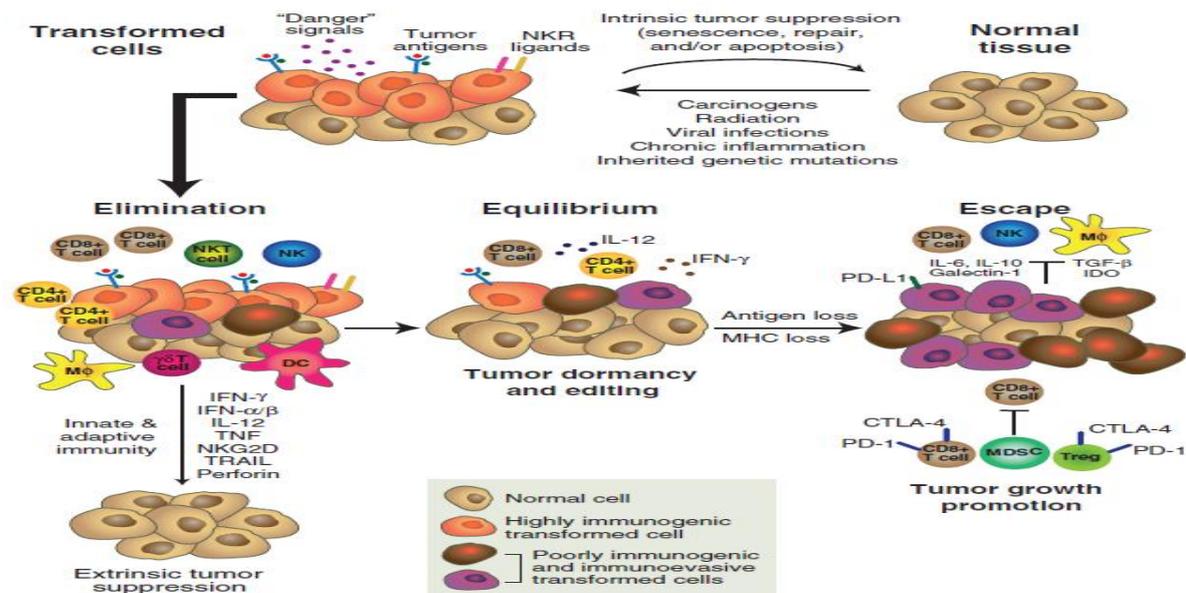
Nos últimos anos o envolvimento do sistema imunitário no cancro tem sido alvo de intensa investigação, tendo sido demonstrado que o SI tem uma grande influência na progressão tumoral (Disis, 2010).

Segundo Mary L. Dysis (2010), o cancro é uma doença inflamatória e a inflamação pode ser importante na resolução do problema, mas também pode despoletar uma ação completamente oposta, promovendo a progressão da doença. De facto, o SI é responsável pela defesa do organismo e divide-se em dois tipos de imunidade: a inata e a adaptativa. A inata é a primeira linha de defesa, não específica, e controla vários mecanismos que impedem a infeção numa primeira fase, nomeadamente a inflamação. Já a imunidade adaptativa funciona como a segunda linha de defesa e, englobando a imunidade celular e humoral, este tipo de imunidade envolve mecanismos somáticos que variam de individuo para individuo e permite uma resposta específica criando memória, embora um início de resposta mais lenta (Abbott e Ustoyev, 2019).

O SI inato engloba a inflamação e esta é importante na resposta anti-tumoral, mas pode revelar-se exatamente o oposto. Sendo responsável pela reparação tecidular cria um ambiente favorável para a proliferação tecidular, favorecendo o aparecimento de mediadores que aumentam o crescimento celular e tumoral. Uma das células relevantes na resposta do SI inato são os macrófagos, responsáveis pela produção de várias citocinas pró-inflamatórias. Estas células podem apresentar dois tipos fenotípicos e funcionais: M1 e M2. Os do tipo M1 estão

envolvidos na produção de interleucina 12 (IL-12) e aumentam o recrutamento de células T citotóxicas que impedem a progressão tumoral. Já as do tipo M2 são responsáveis pela produção de citocinas imunossupressoras e promotoras do crescimento tumoral (Disis, 2010). Em ambiente tumoral, as células M2 são recrutadas em muito maior número despoletando um efeito imunossupressor que diminui a capacidade anti-tumoral providenciada pelo SI.

Tal como referido previamente, a inflamação e a resposta do SI tem uma importância fundamental no combate ou na progressão tumoral. Segundo Robert D. Schreiber e co-autores (2011), a hipótese mais consensual atualmente no seio da comunidade científica é a da imunoeedição tumoral. Os autores referem que o processo de imunoeedição tumoral apresenta três fases: eliminação (1), equilíbrio (2) e escape (3). Numa primeira fase (1) as células cancerígenas são eliminadas através da coordenação do SI inato e adaptativo, que deteta células alteradas e induz a sua destruição antes de ocorrer a formação do tumor. Na fase (2) as células cancerígenas que não foram eliminadas pelo SI não conseguem progredir e formar tumor, uma vez que o SI adaptativo consegue manter estas células num estado de dormência ou latência e, assim, apesar destas não serem eliminadas, não conseguem multiplicar-se e criar malignidade; esta fase é a mais longa e pode durar anos a ser modificada. Na terceira fase (3) as células tumorais desenvolvem mecanismos que lhes permitem evitar o reconhecimento e destruição do SI e progridem para tumores visíveis, provavelmente devido ao aumento da resposta de imunossupressão induzida pelo tumor ou por imunosenescência. A figura que se segue representa os três passos pelos quais a imunoeedição tumoral se rege.



**Figura 6 - Imunoeedição tumoral.**

**Fonte:** Retirado de Schreiber, Old e Smyth, 2011 (com permissão).

A hipótese da imunoeedição tumoral permitiu concluir que o SI, a partir de uma dada fase, não consegue travar a propagação tumoral uma vez que as células tumorais, como já foi referido, apresentam características ou *hallmarks* que lhes permitem subverter e silenciar a resposta imunológica.

Tal como revisto por Daniel S. Chen e Ira Mellman (2017), a resposta imunitária está dependente de células T que são específicas para os antígenos de células tumorais. Suportados por vários estudos, os autores evidenciam que os alvos das células T protetoras anticancerígenas são as alterações genéticas, uma vez que os linfócitos T reconhecem novos epítopos que são gerados pelas células tumorais. Os autores referem ainda que a resposta à imunoterapia pode variar imenso, uma vez que existem inúmeros fatores no processo fisiológico de um indivíduo que podem definir a resposta anti-tumoral. Neste sentido, o ponto de ajuste ou *set point* imunológico do cancro tem extrema importância para gerar imunidade anti-cancerígena. O *set point* imunológico é o balanço entre os fatores estimuladores de uma resposta anti-tumoral e fatores inibitórios de uma resposta anti-tumoral. Um doente com um *set point* baixo consegue uma resposta imune anti-tumoral com mais facilidade, enquanto um *set point* alto dificulta uma resposta anti-tumoral eficaz. A imunoterapia é importante para aumentar os fatores estimulatórios e diminuir os fatores inibitórios. Este *set point* é muitas vezes identificado através de biópsias antes do tratamento e varia de doente para doente. Apesar de ser concetual, o *set point* imunológico fornece uma estrutura de trabalho de forma a organizar a corrente de informação clínica e de biomarcadores que irão surgir no futuro (Chen e Mellman, 2017)(Rizvi *et al.*, 2015).

As mutações também apresentam uma importância enorme na forma como o SI vai dirigir a sua resposta. Segundo Danie S. Chen e Ira Mellman (2017) quanto mais mutações ocorrerem no tumor maior é a probabilidade das células tumorais serem reconhecidas por células T e serem eliminadas. De acordo com estes autores existem as mutações genéticas mais presentes na oncologia, as *truncal mutations*, que ocorrem na fase inicial da oncogénese e são partilhadas pela maioria das células tumorais, facilitando a resposta anti-tumoral, e as *branch mutations*, que ocorrem num período mais tardio da oncogénese e não são partilhadas pela maioria das células tumorais, o que dificulta a resposta anti-tumoral do SI.

Em 2010 foi comprovado cientificamente que as células T conseguem controlar o crescimento tumoral, através do ensaio clínico realizado com ipilimumab num doente com melanoma metastático (Urba *et al.*, 2010). As células T têm a capacidade de reconhecer epítopos de peptídeos, antígenos, que são demonstrados pelos complexos *major* de histocompatibilidade (CMH) na superfície de células tumorais. Existem dois tipos de antígeno, os antígenos de rejeição tumoral que são apresentados por células que não sofreram

mutações e os neoantígenos que são apresentados por células ausentes do genoma humano normal e, por isso, tumorais. Estes neoantígenos podem ser derivados de um vetor viral, dando origem a este tipo de alterações específicas no epitopo do antígeno, mas excluindo a hipótese de serem originados por vetor viral, os neoantígenos são apenas criados por células modificadas geneticamente, o que indica que conseguimos diferenciar as células tumorais das restantes (Schumacher e Schreiber, 2015).

Com as novas tecnologias de sequenciação é possível a identificação de mutações presentes no exoma (parte genética codificadora de proteínas) de um tumor individual e, assim, prever os possíveis neoantígenos. De entre todos os tipos de cancro, o cancro do pulmão, tanto o adenocarcinoma como o CPPC, são os tipos de cancro onde a formação de neoantígenos é mais frequente. O grande problema é que na maioria das mutações os genes não levam à formação de neoantígenos específicos reconhecíveis pelas células T do SI. Assim, assume particular relevância a “filtração” das mutações mais prováveis de criarem neoantígenos, em particular em células com grande carga mutacional, e canalizar os testes genéticos para a identificação destes (Schumacher e Schreiber, 2015).

A resposta do organismo ao tratamento com imunoterapia varia de pessoa para pessoa. Na fisiopatologia do cancro ocorre, numa fase inicial, a libertação de antígenos por parte das células tumorais, a apresentação destes antígenos ao SI, a ativação das células T e o seu encaminhamento e infiltração no tumor e, por fim, o reconhecimento das células cancerígenas e sua destruição. Durante este processo, existem diferentes mecanismos e moléculas necessários para uma resposta anti-tumoral; no entanto, estes mecanismos diferem de organismo para organismo levando a alguma imprevisibilidade relativamente à resposta de uma forma geral. Assim, a resposta ao tratamento com imunoterapia varia de pessoa para pessoa sendo importante compreender os mecanismos que justificam a utilização da imunoterapia em grupos de pessoas com características genéticas semelhantes, tornando-a o mais específica possível e cada vez mais individualizada.

### **2.2.2. Opções terapêuticas na imunoterapia**

Segundo Mary L. Disis (2014) a imunoterapia tem como objetivo aumentar ou restaurar a habilidade do SI para detetar e destruir células tumorais; para tal é importante mudar o equilíbrio novamente a favor da proteção imunitária e aumentar a resposta do SI adaptativo que, devido à sua especificidade e memória, despoleta uma resposta mais duradoura e com melhores resultados clínicos. A autora defende que a imunoterapia permite potenciar a capacidade do SI para combater o tumor e ultrapassar os mecanismos pelos quais este

consegue suprimir o SI progredindo e invadindo outras zonas do organismo.

Atualmente existem dois tipos de imunoterapia: ativa ou passiva. A forma passiva corresponde a uma ativação direta da resposta imune no combate ao tumor e normalmente é realizada através da vacinação cancerígena terapêutica, ocorrendo ativação direta do SI e subsequente desenvolvimento de uma resposta e memória imunológicas. A forma passiva vai atuar evidenciando ou potenciando uma resposta imune já existente, mas que não está a responder eficazmente (Gasparri *et al.*, 2017).

Ao longo dos anos a imunoterapia foi evoluindo e progredindo de acordo com a evolução do conhecimento científico na área. As primeiras abordagens imunoterapêuticas realizadas foram a vacinação cancerígena terapêutica, administração de citocinas como a interleucina 2 (IL-2) e a transferência de linfócitos infiltrados no tumor. Posteriormente, com a descoberta dos neoantígenos tumorais, surgiram terapias relacionadas com a apresentação destes antígenos tumorais ao SI através de células apresentadoras de antígenos.

Como a inflamação e todo o processo inflamatório está envolvido no processo biológico tumoral surgiram novas estratégias relacionadas com a administração de interferões tipo I e agonistas dos recetores *toll-like* (TLR) que ativam a resposta imune inata e influenciam o microambiente tumoral. Mais recentemente, os inibidores de checkpoints imunitários (ICI), têm demonstrado evidência científica e muitos bons resultados através de inúmeros ensaios clínicos e de vários medicamentos já existentes no mercado, particularmente para o tratamento do CPNPC (Disis, 2014).

#### 2.2.2.1. Citocinas

As citocinas, como mensageiros do SI inato e adaptativo, apresentam várias funções biológicas e são classificadas em vários grupos. Estas são glicoproteínas com um tempo de semivida muito curto, sendo algumas ligandos para recetores específicos de superfície celular que ativam vias de sinalização celular e, conseqüentemente a ativação de fatores de transcrição sendo, por isso, responsáveis por alterações da proliferação, diferenciação e funções celulares (Berraondo *et al.*, 2019; Disis, 2014).

As citocinas têm um papel fundamental no processo de maturação das células dendríticas ou células apresentadoras de antígeno. Estas células vão libertar outras citocinas que são responsáveis por modular a ação das células *natural killer* (NK) e a resposta das células T, onde as células T CD4+ e CD8 são ativadas por essas citocinas. Para além da modulação do SI adaptativo, estas também apresentam ação na regulação do SI inato modulando a resposta inflamatória no cancro, quer no término, quer na ativação da mesma, através do aumento da

expressão de antígenos associados ao CMH I, que por sua vez leva ao recrutamento de mais células imunitárias para o local (Showalter *et al.*, 2017).

Segundo Mary L. Disis (2017), existem dois mecanismos através dos quais as citocinas modulam a resposta imunitária anti-tumoral: o primeiro corresponde a um efeito anti-tumoral direto e o segundo através do aumento da capacidade da resposta imune anti-tumoral já existente. O primeiro mecanismo é modulado, por exemplo, por citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6) e o *tumor necrose factor- $\alpha$*  (TNF)- $\alpha$  que atuam diretamente no tumor, mas apresentam toxicidade, pelo que não constituem uma opção válida para os clínicos. O segundo mecanismo está bem estabelecido na prática clínica e funciona através da estimulação da resposta imunitária anti-tumoral existente. Citocinas como a IL-12 e o IFN- $\alpha$  promovem a ativação e proliferação das células T e NK, responsáveis pela destruição das células cancerígenas.

No entanto, as limitações associadas ao uso desta terapêutica prendem-se com o facto de serem moléculas com um tempo de semivida bastante curto e com janelas terapêuticas muito estreitas. Para além disso, apresentam uma modesta eficácia em monoterapia relativamente a outras opções terapêuticas existentes. No entanto, o uso de citocinas foi a primeira demonstração de que a imunoterapia pode influenciar positivamente a resposta imune anti-tumoral (Berraondo *et al.*, 2019).

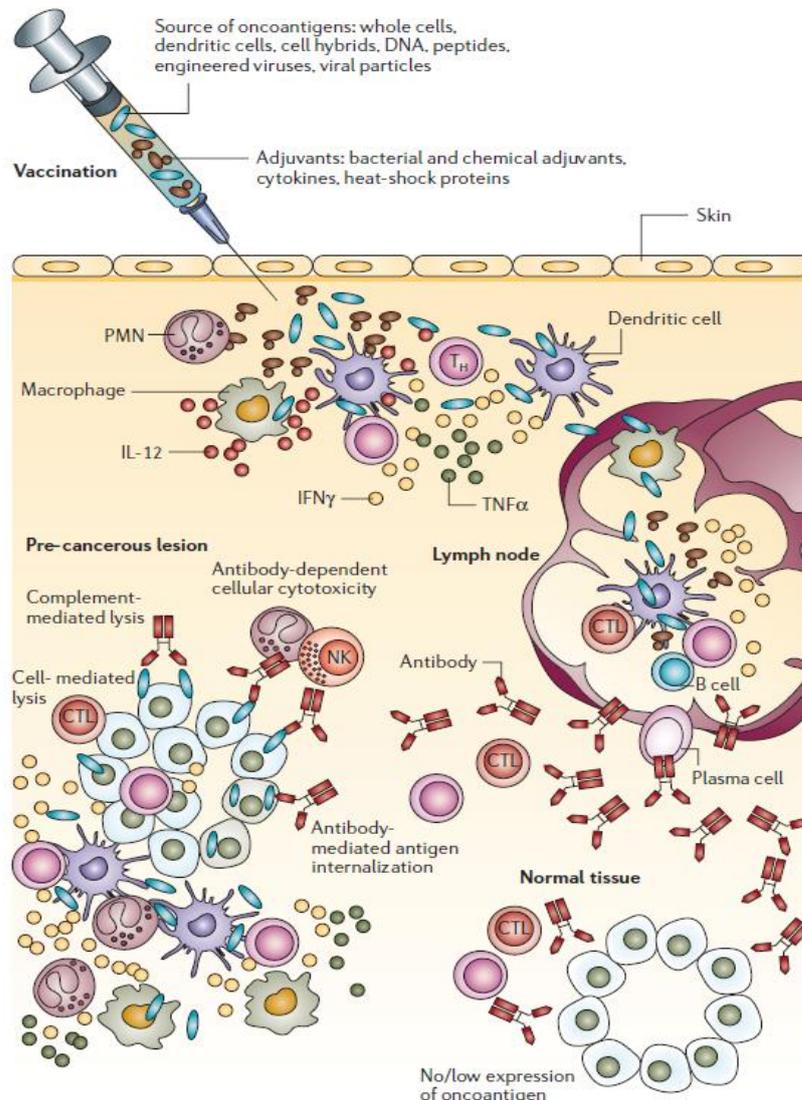
#### 2.2.2.2. Vacinas Terapêuticas cancerígenas

As vacinas terapêuticas cancerígenas (VTC) funcionam como terapêutica anti-tumoral e, ao contrário das vacinas profiláticas que visam prevenir o desenvolvimento da doença num indivíduo saudável, as VTCs são administradas a doentes com cancro e são desenhadas para o eliminar através do fortalecimento da resposta imunitária do próprio doente (Lollini *et al.*, 2006), visando ultrapassar os mecanismos pelos quais o tumor progride e suprime o SI (Disis, 2014).

Segundo Xiang-Yang Wang e coautores (2013) as VTCs têm a capacidade de atacar e destruir especificamente células tumorais, e não células normais, pelo que são usadas em tumores em estadios avançados e/ou em tumores recidivados, que são comuns em cancros que foram removidos cirurgicamente ou que já foram anteriormente tratados com radiação ou quimioterapia.

Para Mary L. Disis (2014) o objetivo das VTC é a apresentação de antígenos associados ao tumor ao SI, originando o aumento da ativação de células imunitárias T e B específicas para

o tumor. Existem três grandes tipos de VTCs: vacinas baseadas em células, vacinas baseadas em proteínas/peptídeos e vacinas genéticas.



**Figura 7** - Reações imunológicas de vacinas ativadas em antígenos associados ao tumor membranares.

**Fonte:** Retirado de Lollini *et al.*, 2006 (com permissão).

- **Vacinas de células tumorais**

As vacinas baseadas em células usam células tumorais autólogas, alogênicas, ou células dendríticas. As vacinas de células tumorais autólogas são derivadas de células tumorais recolhidas do próprio doente e, em conjunto com um agente imunoestimulador, são novamente injetadas no doente. A grande vantagem que este tipo de vacina apresenta é a capacidade e potencial para apresentar o espectro total de antígenos associados ao tumor e ao SI do próprio doente (Guo *et al.*, 2013). Ao ser um tratamento extremamente individualizado, a vacina tem que ser realizada em pequena escala e individualmente,

umentando o seu o custo (Disis, 2014). Por outro lado, este tipo de vacina só é exequível quando é possível obter material tumoral suficiente.

As vacinas alogénicas já são derivadas de linhas celulares tumorais bem estabelecidas e estudadas pela comunidade científica, o que permite ultrapassar várias limitações que as autólogas apresentam, nomeadamente não necessitarem de recolha de material do próprio doente (Disis, 2014) e apresenta a possibilidade de produção em grande escala diminuindo o seu custo (Guo *et al.*, 2013). Contudo, ao contrário da autóloga, a alogénica não tem potencial para apresentar o espectro total de antigénios associados ao tumor, uma vez que não deriva das células tumorais do próprio doente.

Para Xiang-Yang e coautores (2013) as vacinas alogénicas permitem-nos selecionar os antigénios de interesse, visto estes derivarem de linhas celulares tumorais bem estabelecidas tendo, assim, uma fonte ilimitada de antigénios. Além disso, a produção da vacina pode ser realizada em grande escala, a análise dos *outcomes* é mais confiável e controlada, a manipulação da expressão de moléculas imunoestimuladoras é mais fácil e apresenta uma relação custo-benefício melhor relativamente às vacinas autólogas.

- **Vacinas de células dendríticas**

As células dendríticas (CDs) são as células apresentadores de antigénios mais potentes do organismo e funcionam como ponte entre a imunidade inata e adaptativa (Banchereau e Steinman, 1998).

Segundo Jacques Banchereau e A. Karolina Palucka (2005), a resposta adaptativa é induzida, coordenada e regulada pelas DCs, pelo que estas células têm um papel fundamental na resposta imunológica do organismo. As CDs encontram-se nos tecidos periféricos onde capturam os antigénios, processam-nos em pequenos peptídeos, maturam e migram para os nódulos linfáticos onde vão apresentar estes peptídeos processados a células T *naive*, as quais se diferenciam em TCD4+ *helper* e TCD8+ citotóxicos, responsáveis pela imunidade celular e destruição de células tumorais .(Guo *et al.*, 2013). As células dendríticas têm ainda a capacidade de ativar células B de memória que serão importantes numa futura resposta imune ao antígeno apresentado.

As CDs têm sido estudadas visionando a apresentação de antigénios tumorais dos doentes aos linfócitos e, assim, levar à indução de uma resposta imune inata e adaptativa direcionada e estimulada para o tumor. Contudo, sabe-se que existem vários subtipos de células dendríticas que apresentam diferentes respostas e mecanismos quando ativadas. Segundo Jacques Banchereau e A. Karolina Palucka (2005), as células dendríticas imaturas estão intimamente

relacionadas com a tolerância a antígenos, isto é, os antígenos não são apresentados por estas células. O mesmo não acontece com células maturadas onde já existe forte relacionamento com boas respostas imunológicas aos antígenos apresentados. De acordo com os autores, as células dendríticas maduras conseguem ativar os linfócitos T CD8<sup>+</sup> e polarizar linfócitos T CD4<sup>+</sup>, que produzem interferões, como o interferão alfa (IFN- $\alpha$ ), que aumenta e estimula a resposta inflamatória e imunológica.

Para Bernhard Frankenberger e Dolores J. Schendel (2012), para uma ótima ativação da imunização inata e adaptativa anti-tumoral são necessários três sinais interativos na biologia das células dendríticas: (i) carregamento adequado dos complexos peptídeo-MHC nas células dendríticas, (ii) co-estimulação positiva de moléculas como o CD40, CD80 e CD86 e (iii) produção de citocinas que polarizam respostas imunes Th1/Tc1.

A preparação de vacinas baseadas em DCs consiste, na maioria dos casos, na recolha de monócitos do próprio doente e diferenciação em células dendríticas. Posteriormente, estas células são carregadas com antígenos associados ao tumor em conjunto com adjuvantes que potenciam a resposta destas células. Seguidamente, as células carregadas com os antígenos são novamente administradas no doente. As DCs podem ser carregadas com peptídeos derivados do tumor, células tumorais, podendo ainda a vacina resultar da fusão de células tumorais e células dendríticas (Guo *et al.*, 2013).

Em 2010, em resposta ao cancro da próstata, a Food and Drugs Administration (FDA) aprovou a primeira vacina terapêutica derivada de células dendríticas, a Sipuleucel-T (Provenge<sup>TM</sup>). No geral, esta foi a vacina derivada de células dendríticas que melhor resultado apresentou com baixa toxicidade e boa tolerância, embora tenha apresentado uma modesta eficácia. Este facto realça a necessidade de melhoria e otimização desta opção terapêutica. Para isso, tem sido estudada a hipótese de combinar estas células com diferentes potenciadores da resposta imunitária ou até mesmo realizar a administração em combinação com radioterapia ou quimioterapia (Guo *et al.*, 2013).

- **Vacinas Terapêuticas baseadas em proteínas/peptídeos**

O aparecimento de vacinas recombinantes baseadas em peptídeos derivados de antígenos associados ao tumor, administrada em conjunto com moduladores imunitários que estimulam a resposta imunitária, apresenta claras vantagens relativamente às vacinas autólogas. Estas vacinas baseadas em proteínas ou peptídeos proveniente de antígenos associados ao tumor relevaram ser uma alternativa relevante, visto terem capacidade para serem produzidas em grande escala, ao contrário das vacinas autólogas de células tumorais ou de células dendríticas

(Guo *et al.*, 2013).

Os grandes avanços no conhecimento da genética nos últimos anos forneceram à comunidade científica informação relevante relativamente às características genéticas do cancro. Desde a descoberta do MAGE-1, o primeiro gene codificador de antigénios tumorais reconhecidos por células T, a investigação e descoberta de novos antigénios associados ao tumor tem aumentado consideravelmente (Novellino, Castelli e Parmiani, 2005).

Para Xiang-Yang e coautores (2013), esta identificação de novos antigénios associados ao tumor fornece a oportunidade de desenhar VCTs direcionadas. Para os autores, existem várias categorias de antigénios associados ao tumor: (i) antigénios *cancer-testis* (MAGE, BAGE, NY-ESO-1, SSX-2) codificados por genes que normalmente estão silenciados mas cuja transcrição é ativada em células cancerígenas, (ii) antigénios de diferenciação tecidual que são apresentados tanto em tecido normal como em tecido tumoral e (iii) antigénios específicos para tumor único codificado por oncogenes (RAS, BRAF). Ao desenhar uma vacina com peptídeos de antigénios específicos para o tumor único a imunoseleção é evitada e a eficácia é maior. Os tipos de antigénios mais investigados em ensaios clínicos a decorrerem atualmente são antigénios do tipo *cancer-testis* e antigénios de diferenciação tecidual (Guo *et al.*, 2013).

De acordo com Giorgio Parmiani e coautores (2002) existem várias vantagens no uso de vacinas baseadas em proteínas relativamente a outras: a produção fácil e relativamente barata de peptídeos sintéticos, simplicidade de administração em ambiente clínico, possibilidade de tratamento de doentes que apresentem o epítipo correspondente ao antigénio pretendido evitando imunização em doentes que não o apresentam e a existência de testes *in vivo* e *ex vivo* que avaliam a resposta imune do doente aos epítipos da vacina.

De acordo com Mary L. Disis (2014), estas vacinas apresentam algumas desvantagens, uma vez que direcionam a resposta para um ou poucos epítipos do antigénio associado ao tumor, e os peptídeos de antigénios associados ao tumor não são processados da mesma forma que os antigénios de células tumorais, o que pode levar a uma resposta imunitária mediada por células T deficitária ou até mesmo inexistente.

Em contexto de ensaios clínicos, este tipo de VCT apresentou resultados muito limitados (Parmiani *et al.*, 2002) (Neek, Kim e Wang, 2019); contudo o avanço do conhecimento nesta área irá certamente potenciar a utilização destas vacinas em estratégias anti-tumorais.

- **Vacinas Terapêuticas Genéticas**

Outra das estratégias anti-tumorais passa pela apresentação de antígenos *in vivo* através de vetores virais ou de vetores de plasmídeos de DNA transportando a informação genética relevante. Depois da sua administração, estes vetores são transferidos para células somáticas ou células dendríticas que se infiltram no tecido muscular ou na pele como parte da resposta inflamatória despoletada no local, resultando na apresentação de antígenos endógenos (*direct-priming*) ou de antígenos exógenos (*cross-priming*) (Guo *et al.*, 2013; Norbury e Sigal, 2003).

A vacinação genética de DNA consiste na inoculação de plasmídeos de ADN codificador de proteínas de antígenos associados ao tumor. Após inoculação da vacina, o antígeno vai ser produzido e é libertado ou direcionado para membranas celulares, sendo posteriormente captado por células apresentadoras de antígeno que o apresenta ao SI, nos nódulos linfáticos (Aurisicchio e Ciliberto, 2012).

A grande vantagem que as vacinas genéticas apresentam é a fácil apresentação de grandes quantidades de antígenos com apenas uma imunização, capaz de ativar várias células da resposta imunitária (Disis, 2014).

Segundo Luigi Aurisicchio e Gennaro Ciliberto (2012), as vacinas de ADN apresentam inúmeras vantagens, (i) conseguem induzir elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias no local da injeção, os quais ativam células dendríticas endógenas, (ii) aumentam a expressão e/ou captação de antígenos por células apresentadoras de antígenos maximizando a exibição de epítomos de moléculas do MHC tipo I confluindo na ativação da resposta das células T CD8+, (iii) proporciona uma resposta para vários epítomos dos antígenos pretendidos sem a limitação das restrições do CMH tipo I, (iv) a manipulação de antígenos é fácil e consegue gerar mais versões imunogénicas e entregar vários antígenos sem necessidade de produção de proteínas recombinantes relevantes e (v) a criação de genes de fusão entre zonas de codificação de antígenos ou codificação de DNA de epítomos conhecidos é fácil, o que ajuda a criar uma resposta de memória por células T helper. Para além das vantagens apresentados, os autores referem que estas vacinas também apresentam algumas limitações, como a baixa entrada celular de plasmídeos de DNA e a sua difícil localização nuclear em células vivas e quando não existe uma resposta inflamatória, as células apresentadoras de antígenos não apresentam moléculas estimuladoras necessárias para uma ativação de células T.

Como alternativa à vacinação de ADN existem as vacinas de ARN e as vacinas com vetores virais como veículos. A vacinação de ARN consiste na injeção do produto de transcrição do DNA, o mARN. Com a sua administração é expectável que tanto a expressão de antígenos como a estimulação imunológica sejam realizados por mecanismos similares aos da vacinação

de DNA. Esta vacina apresenta menor toxicidade que as de DNA devido à sua degradação e eliminação ser realizada de forma mais célere, tendo um tempo de semivida muito menor (Auricchio e Ciliberto, 2012; Guo *et al.*, 2013).

A utilização de vírus como vetores ou veículos está relacionada com o facto de que as infeções virais frequentemente resultam na apresentação de peptídeos específicos do vírus em células infetadas por este (Guo *et al.*, 2013). A vacinação realizada com vetores baseados em vírus baseia-se na inserção de material genético com codificação para os antígenos pretendidos no genoma viral, substituindo genes virais essenciais para a atividade do vírus. O principal objetivo é usar estes vírus como vetores, isto é, após administração, estes irão transportar o material genético pretendido para a célula do hospedeiro, que por sua vez irá transcrever o material genético pretendido com estimulação subsequente do SI. Nem todos os vírus podem atuar como vetores, os vetores ideais são os que têm grande capacidade de apresentação dos antígenos associados ao tumor e apresentam uma baixa imunogenicidade, permitindo a sua administração regular com aumento da probabilidade de sucesso da terapêutica (Auricchio e Ciliberto, 2012).

- **Vacinação no CPNPC**

Inicialmente, o CPNPC não era dado como altamente imunogénico devido à baixa presença de células T infiltradas no tumor nas lesões, pelo não era considerado candidato para a vacinação terapêutica (Mellstedt, Vansteenkiste e Thatcher, 2011). Mais tarde, modelos animais revelaram a ativação do SI e regressão tumoral com a administração de células dendríticas modificadas (Patrice W. Miller *et al.*, 2000), e foi identificada a resposta de células T a antígenos específicos de tumor em doentes com cancro do pulmão. Assim, a identificação de antígenos relacionados com o cancro do pulmão e apresentação destes em contexto ideal tornou-se uma ideia bastante viável. Apesar de todo o conhecimento existente relativamente ao CPNPC a vacinação nesta doença ainda se encontra numa fase inicial. A maior parte das vacinas encontram-se em ensaios clínicos, sendo que algumas delas apresentaram resultados promissores. As vacinas que se encontram neste momento em estudos clínicos incluem: vacina de células tumorais alogénica Belagenpumatucel-L (Lucanix<sup>®</sup>), vacina recombinante baseada no EGF (CIMAvax<sup>®</sup>), vacina baseada em proteínas MAGE-A3, vacina direcionada à proteína Mucin I (MUC1), vacina com vetor viral TG4010 que expressa MUC I e IL-2 e vacina L-BLP25 (Stimuvax<sup>®</sup>) (Mellstedt, Vansteenkiste e Thatcher, 2011).

### 2.2.2.3. Terapêutica com células T adotadas (CTA)

Ao longo dos últimos anos, as células T tornaram-se bons alvos terapêuticos dada a capacidade anti-tumoral que estas apresentam. Assim, a adoção de células T tem sido investigada, visando tornar a resposta anti-tumoral mais robusta (Met *et al.*, 2019), e os resultados obtidos são promissores.

Com a adoção de células T realiza-se uma infusão das mesmas, tendo estas sido previamente manipuladas geneticamente para direcionar e melhorar a resposta anti-tumoral (Yee, 2018). Tal como referido por Cassian Yee (2018), existem 3 modalidades de CTA: terapia com linfócitos T infiltrados no tumor, terapia com células T com recetor antigénico quimérico ou recetores celulares naturais de células T modificados geneticamente e a terapia com células T endógenas.

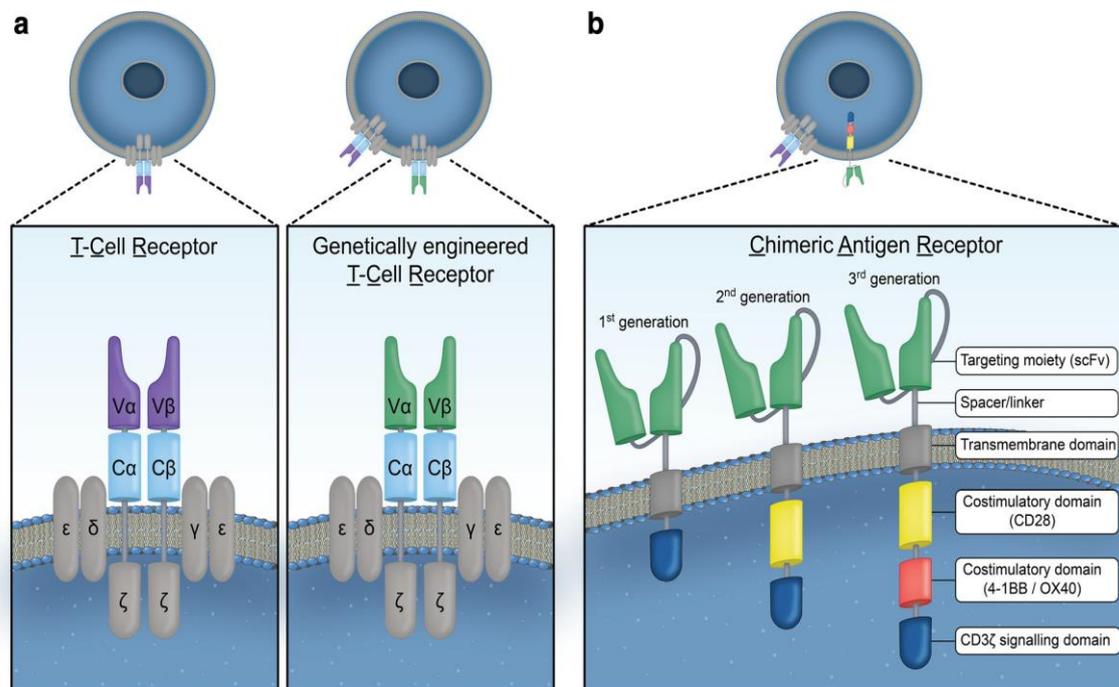
A primeira modalidade de CTA baseia-se na capacidade anti-tumoral que os linfócitos infiltrados no tumor (LIT) possuem. Este tipo de linfócitos são uma população heterogénea de células T e NK que migram para o tumor e estão presentes em praticamente todos os tumores sólidos, mas que se apresentam em pequeno número (Met *et al.*, 2019). Este modelo de CTA permite a expansão em grande número *in vitro* dos LIT para depois ser realizada a sua transferência novamente para o doente (Yee, 2018). A sua expansão só é possível graças à descoberta de Steve Rosenberg (2003) que evidenciou o facto de ao expor os LIT a altas doses de IL-12 (factor de crescimento de células T), ocorrer uma rápida e estável expansão das mesmas. A desvantagem que esta modalidade apresenta é a sua toxicidade, pelo que atualmente é maioritariamente usada no tratamento do melanoma.

A segunda modalidade é mais recente e advém dos avanços tecnológicos genéticos dos últimos anos. Segundo Özcan Met (2019), as mudanças genéticas das células T baseiam-se na evidência de que a modificação genética destas células melhora e estimula a função imunológica anti-tumoral, nomeadamente quando a resposta imune específica para o tumor falha na especificidade antigénica. Ao modificar geneticamente os recetores de superfície celular das células T (RCT), estes adquirem a capacidade de reconhecer peptídeos de antigénios tumorais que são apresentados via CMH I. Assim, ao alterar geneticamente estes recetores através da modificação das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , como apresentado na Fig. 5., a especificidade das células também se vai alterar de acordo com o antigénio que se pretende reconhecer. Deste modo, os RCT que reconhecem antigénios tumorais são clonadas e expandidos em células T *ex-vivo*, e administrados novamente no doente (Met *et al.*, 2019). Embora a identificação dos RCT pretendidos tenha sido conseguida, as células T com RCTs modificados só podem ser usados em doentes que apresentem o alelo específico de CMH. Apesar desta limitação, esta

modalidade permite ainda o *target* de mais alvos terapêuticos (Yee, 2018).

A modificação genética de linfócitos para redirecionar a especificidade foi proposta, pela primeira vez, através do *chimeric antigen receptor* (CAR) de dupla cadeia e depois de cadeia única (Fig. 5). Existem duas gerações de CAR, a primeira geração é composta por uma região de ligação de antígeno, fundindo o domínio da sinalização das células T com sinais de transdução dos recetores de células T (Fig. 5), ocorrendo a ativação da primeira sinalização das células T.

Os CAR de segunda geração apresentam um domínio adicional co-estimulador (CD28 ou 4-1BB). A segunda geração de CAR apresentou melhores resultados em estudos clínicos em tumores hematológicos, nomeadamente em linfomas e leucemias, contudo apresentou piores resultados em tumores sólidos. Os CAR de terceira geração estão a ser ainda estudados de forma a potenciar e melhorar a resposta a este tratamento (Met *et al.*, 2019). Ao contrário das células T com RCT modificados, estas não precisam de processamento ou de apresentação por moléculas do CMH, o que significa que todas as moléculas alvo expressas à superfície células são potenciais epítomos de ativação dos CAR (Met *et al.*, 2019).



**Figura 8** - Tipos de modificação dos recetores das células T.

**Fonte:** Retirado de Met *et al.*, 2019 (com permissão).

A utilização de células modificadas geneticamente abriu novas oportunidades terapêuticas, mas estas apresentam desvantagens relacionadas com toxicidade: tanto podem destruir células

tumorais como normais, apresentam reatividade *off-target*, isto é, reagem com peptídeos que são alvo e que não são alvo; podem induzir o síndrome de libertação de citocinas, aumentando drasticamente e rapidamente o número de citocinas inflamatórias (Met *et al.*, 2019).

A terceira modalidade da terapêutica com células T adotadas passa pela utilização de células T endógenas. Para Cassian Yee (2018), esta modalidade consiste na detecção de células T reativas ao tumor que estão presentes no doente, principalmente em sangue periférico, isolar estas células e expandi-las. Esta estratégia apresenta relativamente baixa toxicidade, maior flexibilidade e uma transição mais rápida entre a descoberta de antígenos e o próprio tratamento, e ainda a capacidade para criar células T mais duradouras.

#### 2.2.2.4. Coestimulação e coinibição de células T

A ativação das células T é extremamente importante para que ocorra uma resposta imune anti-cancerígena. Recetores e moléculas co-estimuladoras e co-inibidoras têm demonstrado uma ação fundamental na regulação e ativação das células T (Chen e Flies, 2013).

Tal como revisto por Rachel E. O'Neill e Xuefang Cao (2019), a ativação de células T envolve dois sinais fornecidos pelas células apresentadoras de antígeno. O primeiro é a apresentação do antígeno na forma de peptídeo associado a MHC levando à especificidade das células T. O segundo é providenciado pelos ligandos coestimuladores das células apresentadoras de antígeno que vão interagir com os recetores correspondentes na superfície celular das células T, sem a coestimulação as células T morrem ou ficam anérgicas. Após ocorrerem os primeiros dois sinais, Mary Cavanagh (Cavanagh, [s.d.]) defende que existe ainda um terceiro passo, que consiste na estimulação por citocinas inflamatórias que faz com que as células T se diferenciem nos tipos de células T que possuem funções específicas na resposta imunológica. Os sinais coestimuladores são cruciais para a ótima proliferação, diferenciação e sobrevivência das células T sendo, por isso, necessários para uma resposta imune eficaz. Neste sentido, os recetores coestimulatórios constituem bons alvos terapêuticos, sendo ótimos candidatos para a imunoterapia, uma vez que a sua expressão é muito versátil e responsiva a mudanças no ambiente celular (O'Neill e Cao, 2019).

O eixo de sinalização CD28-B7 e os recetores coestimuladores OX40 e 4-1BB estão a ser investigados. O eixo de sinalização CD28-B7 amplifica a sinalização dos RCT e aumenta a produção de citocinas inflamatórias, como a IL-12, que favorece a proliferação e sobrevivência das células T (Zhang e Vignali, 2016). Já o recetor OX40 pertence à superfamília de recetores TNF, é predominantemente expresso em células T CD4+ e CD8+ e está envolvido na regulação da proliferação e sobrevivência das células T, na produção de citocinas inflamatórias

e na regulação das células Thelper 1 e Thelper 2 (Jensen *et al.*, 2010). O recetor 4-1BB também pertence à superfamília TNF e está igualmente envolvido no processo de estimulação de células T e NK (Lynch, 2008).

Os ensaios clínicos de imunoterapia realizados nos últimos anos têm demonstrado o potencial destas moléculas, indiciando resultados promissores num futuro próximo.

#### 2.2.2.5. Inibidores de checkpoint imunitários

A descoberta dos checkpoints imunitários foi revolucionária na imuno-oncologia. Tal como explanado previamente, as células tumorais conseguem, por vários mecanismos, ultrapassar a imunovigilância. Um dos mecanismos usados é a utilização de checkpoints imunitários que reprimem o SI (Darvin *et al.*, 2018). Tal como revisto por Humera Memon e Bhoomika M. Patel (2019), as células cancerígenas são células mutadas do próprio organismo, o que leva a que o SI não as consiga distinguir das células não malignas. As células T apresentam proteínas que atuam como interruptores *off* (checkpoints) que previnem a destruição de outras células do organismo pelas próprias células T. Ao interagirem com outras células imunitárias, estes checkpoints atuam como método comunicativo, de forma a permitir o reconhecimento de células endógenas e na tolerância periférica e, assim, impedirem as células imunitárias de atacar outras células imunitárias ou tecido saudável (Madden e Kasler, 2019). Para ocorrer inibição da atividade das células T, estes checkpoints imunitários iniciam a sinalização inibitória que permite a sobrevivência das células tumorais. Neste sentido, a função dos inibidores de checkpoint imunitários (ICI) é interromper as cascatas de sinalização inibitórias e promover a eliminação imunomediada das células tumorais (Darvin *et al.*, 2018). Por outras palavras, os ICI influenciam a resposta imune a bloquear ou remover mecanismos naturais que existem para travar ataques autoimunes ao tecido normal (Madden e Kasler, 2019).

Os checkpoints imunitários existentes no CPNPC são: *programmed cell death – 1* (PD-1) e *CD28 cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA-4). O PD-1 é um recetor de superfície celular co-inibidor expresso em células T ativadas, para além de outras células imunitárias (Memon e Patel, 2019). O recetor é responsável pela produção de citocinas, inibição da indução do factor de sobrevivência celular e expressão de factores de transcrição associados à função celular, inibe a resposta das células T e está expresso em grande número de linfócitos infiltrados no tumor (Keir *et al.*, 2008). Os seus ligandos, PD-L1 e PD-L2, são expressos pelas células tumorais. Em ambiente tumoral a falta de resposta das células T é resultado da presença do PD-1 e seus ligandos no microambiente tumoral. A utilização de anticorpos monoclonais que

bloqueiam a ligação do PD-1, como por exemplo o Pembrolizumab e Nivolumab, tem sido investigada, tendo estes dois anticorpos sido aprovados para várias linhas de tratamento do CPNPC (Memon e Patel, 2019).

O CTLA-4 e CD28 são recetores homólogos, estruturalmente muito parecidos, expressos por células T CD4+ e CD8+ que medeiam funções opostas na ativação das células T. Estes checkpoints apresentam dois ligandos (CD80 e CD86), e ambos os checkpoints competem para a ligação aos respetivos ligandos. O CD28 está intimamente ligado à estimulação das células, aumentando a resposta imunitária, enquanto o CTLA-4 está envolvido na sua supressão atuando como regulador negativo da resposta das células T (Rowshanravan, Halliday e Sansom, 2017). O bloqueio do CTLA-4 através de anticorpos monoclonais como o Ipilimumab e o Tremelimumab, tem evidenciado bons resultados no aumento da imunidade anti-tumoral. (Memon e Patel, 2019), tendo mesmo conseguido aprovação para linhas de tratamento do CPNPC.

O CPNPC é reconhecido como um dos tipos de cancro altamente imunogénico que mais contribuiu para o impacto brutal nas taxas de resposta e sobrevivência no cancro, devido aos avanços na terapêutica com ICI (Madden e Kasler, 2019).

## **2.3. Pembrolizumab**

### **2.3.1. Propriedades Farmacológicas, características do fármaco e mecanismo de ação**

Ao longo desta revisão literária, o conteúdo descrito teve como objetivo realçar a importância e o desenvolvimento da imunoterapia em oncologia, em particular no CPNPC. De facto, a imunoterapia tem demonstrado enorme potencial, em especial no CPNPC, devido ao seu potencial imunogénico.

O pembrolizumab, fabricado e comercializado pela MERCK, tem-se revelado um fármaco anti-tumoral com grande eficácia e relativamente poucos efeitos adversos quando comparado com a quimioterapia clássica. Keytruda ou Pembrolizumab, é um anticorpo monoclonal humanizado IG44 kappa anti-PD-1, comercializado sob a forma de pó liofilizado e reconstituído em 0,9% de solução de cloreto de sódio numa concentração de 1-10 mg/ml. Apresenta estabilidade à temperatura ambiente durante 4 horas e a 4°C durante 24 horas. A sua administração é realizada intravenosamente numa infusão de 30 minutos. Relativamente à sua farmacocinética, apresenta um aumento proporcional à dose em pico, através de várias concentrações e *steady-state* na área sob a curva (AUC). Em dosagens de 1-10 mg/kg de 2 em

2 semanas ou 2 mg/kg de 3 em 3 semanas apresenta uma clearance de 0,22L/dia e um tempo de semivida de 26 dias. A sua clearance aumenta com o aumento do peso corporal, originando dosagens baseadas no peso. Ao serem realizadas administrações de 3 em 3 semanas atinge-se a concentração em *steady-state* em 18 semanas. A sua clearance não é afetada pela perda de função renal ou por perda ligeira de função hepática (Kwok *et al.*, 2016). O pembrolizumab, quando utilizado em monoterapia, é administrado em doses ou de 200 mg de 3 em 3 semanas ou 400 mg de 6 em 6 semanas, e quando administrado em conjunto com outras terapêuticas é sempre utilizado numa dosagem de 200 mg de 3 em 3 semanas (Agency, 2019).

Tal como referido previamente, o PD-I é um checkpoint imunitário que possui um trajeto molecular dominante no microambiente tumoral, onde a sua função de controlar a homeostase imunológica é utilizada pelas células cancerígenas para evadir o sistema imunológico (Topalian *et al.*, 2016). O PD-I consiste num recetor membranar presente em inúmeras células imunológicas como células T ativadas, NK, células B, entre outras, e tem como função principal a regulação da atividade e resposta imunológica mediada pelas células T. O recetor possui dois ligandos PD-L1 e PD-L2 que estão presentes em células imunológicas e também em células tumorais. Vários estudos realizados nos últimos anos demonstraram evidência de que a expressão de PD-L1 está intimamente relacionado com a eficácia dos anticorpos anti-PD-I (Kambayashi *et al.*, 2019), uma vez que as células tumorais utilizam estes ligandos para regular e controlarem a expressão e capacidade de resposta das células T, de forma a conseguirem evadir o SI e estabelecerem o tumor. O pembrolizumab, sendo um anti-PD-I previne a interação do PD-I das células T com o respetivo ligando das células tumorais, e consequentemente origina a restauração da imunidade anti-tumoral mediada pelas células T (Kwok *et al.*, 2016).

Este medicamento apresenta várias aprovações por parte da Agência Europeia do Medicamento para várias doenças: melanoma, CPNPC, linfoma de Hodgkins, cancro urotelial, cancro escamoso da cabeça e pescoço e carcinoma renal (Agency, 2019).

### **2.3.2. Perfil de Segurança**

Atualmente o tratamento de CPNPC é ainda muito baseado na utilização da quimioterapia clássica, que apresenta uma elevada toxicidade e compromete a qualidade de vida do doente. A imunoterapia e, principalmente os inibidores de checkpoints imunitários, revelaram ser uma excelente alternativa, visto apresentarem bons resultados ao nível de eficácia e pouca toxicidade relativamente à quimioterapia clássica.

Na meta-análise realizada por Manni Wang, Xuelei Ma, Linghong Guo e Fan Xia (2017),

foram recolhidos dados de 3922 doentes que participaram em vários ensaios clínicos com pembrolizumab. Os efeitos adversos mais comuns foram os dermatológicos, com *rash* e prurido, e ainda diarreia, náuseas, mialgias, artralgia e pneumonite. A incidência de qualquer evento adverso relacionado com o tratamento foi de 74,3%. Para além destes efeitos adversos mais comuns, a xerostomia e a perda de apetite apresentaram uma incidência relevante. Relativamente a efeitos adversos severos, a meta-análise revelou que estes foram bastante raros, sendo o mais comum a hiponatremia.

Noutra meta-análise realizada por Shrujal Baxi e coautores (2018), verificou-se que os doentes tratados com anti-PD-I e anti-PD-LI apresentam diferentes efeitos adversos quando comparados com doentes que realizaram outras terapêuticas, nomeadamente efeitos adversos relacionados com SI. A análise compreendeu dados de 6676 doentes de 13 estudos diferentes, onde 3383 foram tratados com anti-PD-I ou anti-PD-LI (primeiro braço) e os restantes 2873 foram tratados com quimioterapia (segundo braço). Em doentes do primeiro braço os efeitos adversos relacionados com o SI mais comuns foram o hipotiroidismo (214 – 5,6%), pneumonite (85 – 2,2%), colite (25 – 0,7%), hepatite (6 – 0,2%) e hipofisite (11 – 0,3%). Relativamente a efeitos adversos severos a pneumonite foi o mais comum com 54 casos (1,4%), sendo que os restantes efeitos adversos severos foram o hipotiroidismo, hepatite e hipofisite, todos com incidências inferiores a 1%. Este estudo permitiu ainda constatar que os doentes do primeiro braço têm um maior risco de contrair colite e pneumonite, mas não apresentam risco aumentado de contrair hepatite. Em termos de efeitos adversos gerais os mais comuns foram a fadiga, diarreia e o *rash* cutâneo.

Na meta-análise realizada por Yi Zhang e coautores (2016), analisou-se a eficácia e segurança dos anti-PD-I no tratamento de cancro em estadio avançado ou que tiveram recidiva, tendo-se verificado que em doentes tratados com anti-PD-I a incidência de efeitos adversos foi menor, relativamente aos doentes sujeitos a quimioterapia. Assim, dos 1000 doentes analisados, 376 apresentaram efeitos adversos, enquanto doentes tratados com anti-PD-I apresentaram 184.

O pembrolizumab tem revelado dados bastante interessantes ao nível da segurança, apesar do seu uso na clínica ser muito recente. Neste sentido, assume particular relevância o controlo e vigilância regular deste medicamento.

### **2.3.3. Estudos clínicos e resultados do uso de pembrolizumab em doentes com CPNPC em estadio avançado**

O uso na prática clínica do pembrolizumab é ainda bastante recente. Até à sua aprovação para o tratamento de diversas patologias, nomeadamente CPNPC, este medicamento foi intensamente investigado e testado em diversos ensaios clínicos onde demonstrou, nas condições adequadas impostas pelo protocolo dos ensaios, resultados bastante promissores que valeram a sua aprovação por parte das entidades reguladoras.

O pembrolizumab foi estudado em diversos ensaios, denominados *Keynote*, financiados pela indústria que o produziu, a Merck Sharp & Dome. Atualmente, o seu estudo continua com vários ensaios clínicos, em recrutamento e a decorrerem atualmente. Os ensaios clínicos já finalizados e com resultados divulgados são os seguintes: Keynote-001, Keynote-010, Keynote-024, Keynote-025, Keynote-042, Keynote-189, Keynote-407.

O estudo Keynote-001 tinha como objetivo verificar as diferenças na dosagem em doentes com CPNPC local ou avançado. O primeiro braço realizou 2 ou 10 mg/kg de 3 em 3 semanas e segundo braço realizou 10 mg/kg de 2 em 2 semanas. Os resultados obtidos revelaram que, em ambos os braços, o pembrolizumab foi bem tolerado e revelou atividade anti-tumoral e ainda que o nível de expressão de PD-L1 está positivamente relacionado com a eficácia do medicamento (Garon *et al.*, 2015).

O Keynote-010 foi realizado numa população de doentes com CPNPC de doença avançada que já tinham sido anteriormente tratados com quimioterapia clássica, sendo o objetivo comparar o uso de pembrolizumab *versus* docetaxel. Este apresentou 3 braços de tratamento, o primeiro com pembrolizumab numa dosagem de 2mg/kg de 3 em 3 semanas, o segundo com pembrolizumab 10 mg/kg de 3 em 3 semanas e o terceiro com docetaxel a 75 mg/m<sup>2</sup>, também de 3 em 3 semanas. Ao nível de sobrevivência global, o primeiro braço apresentou 10,4 meses, o segundo 12,7 meses e o terceiro 8,5 meses. Ao nível de sobrevivência livre de progressão o primeiro braço apresentou 3.9 meses, o segundo 4 meses, e o terceiro 4 meses. Os doentes que apresentaram uma expressão de PD-L1 superior a 50% obtiveram resultados significativamente melhores relativamente aos que apresentaram PD-L1 inferior a 50%, nos braços de pembrolizumab. Os efeitos adversos foram em muito menor número no braço de pembrolizumab comparativamente ao braço de docetaxel (Herbst *et al.*, 2016).

O Keynote-024 foi realizado em doente com CPNPC com expressão de PD-L1 superior a 50% e apresentou dois braços: pembrolizumab numa dose fixa de 200 mg de 3 em 3 semanas ou quimioterapia baseada em platinos. Em termos de sobrevivência global aos 6 meses, o

primeiro braço obteve 80,2% e o segundo 72,4%. Relativamente à sobrevivência livre de progressão o primeiro teve 10,3 meses e o segundo 6 meses. Em relação a efeitos adversos o braço de pembrolizumab apresentou um número significativamente menor que o braço de quimioterapia. Ao nível de todos os *endpoints* do estudo, o braço de pembrolizumab apresentou resultados significativamente melhores que o braço de quimioterapia (Reck *et al.*, 2016). Posteriormente, foi realizado uma extensão deste estudo na população do Japão, o Keynote-025, que apresentou a mesma consistência de resultados obtidos no Keynote-024.

O ensaio Keynote-042 recolheu informação de doentes com CPNPC avançado ou metastático sem tratamento prévio. A expressão de PD-L1 tinha de ser superior a 1%. O ensaio apresentou dois braços de estudo, o primeiro foi o de doentes a receberem pembrolizumab em dose fixa de 200 mg de 3 em 3 semanas durante 35 ciclos, e o segundo 4 a 6 ciclos de quimioterapia de platino. O braço de pembrolizumab apresentou uma mediana de sobrevivência de 20 meses, enquanto o braço de quimioterapia de 12,2 meses. A sobrevivência global foi significativamente maior no grupo de pembrolizumab. 18% dos doentes que estavam no primeiro braço apresentaram efeitos adversos e 43,6% dos que se apresentavam no segundo braço tiveram efeitos adversos severos relacionado com o tratamento (Mok *et al.*, 2019).

O ensaio duplamente oculto Keynote-189 foi realizado como primeira linha de tratamento de CPNPC avançado, e os braços de estudo foram: pemetrexed mais quimioterapia e pembrolizumab fixo de 200 mg 3 em 3 semanas seguido de manutenção com a mesma dosagem de pembrolizumab ou pemetrexed mais quimioterapia e placebo seguido de manutenção com placebo. Relativamente a sobrevivência global a 12 meses o primeiro braço revelou 69,2% e o segundo 49,4%. Em termos de sobrevivência livre de progressão, o primeiro braço apresentou 8,8 meses e o segundo 4,9 meses. Os efeitos adversos de grau 3 ou superior foram relatados em 67,2% do grupo do pembrolizumab e em 65,8% da população que tomou placebo.

O Keynote-407 foi realizado em doente com CPNPC escamoso que apresentou dois braços, o primeiro relativo a doentes tratados com pembrolizumab 200 mg 3 em 3 semanas, e o segundo com placebo e os doentes em ambos os braços foram previamente tratados com 4 ciclos de quimioterapia. Relativamente à mediana de sobrevivência global, o primeiro braço apresentou 15,9 meses e o segundo 11,3 meses. Em termos de sobrevivência livre de progressão, o primeiro teve 6,4 meses e o segundo 4,8 meses. Os efeitos adversos foram similares em ambos os braços de tratamento (Paz-Ares *et al.*, 2018).

Todos os ensaios clínicos acima descritos revelaram dados muito interessantes relativamente ao uso do pembrolizumab no CPNPC. Em todos eles, tanto em relação à

sobrevivência global, como em relação à sobrevivência livre de progressão, os resultados dos doentes que foram tratados com este fármaco foram significativamente superiores aos obtidos com tratamentos convencionais. Deste modo, o pembrolizumab apresenta um enorme potencial terapêutico, uma vez que apresenta eficácia e segurança superiores aos tratamentos convencionais, sendo uma alternativa válida para o tratamento do CPNPC.

### **3. METODOLOGIA – ESTUDO OBSERVACIONAL UNICÊNTRICO DE DADOS DO MUNDO REAL RELATIVOS AO TRATAMENTO COM PEMBROLIZUMAB DE DOENTES PREVIAMENTE TRATADOS, COM CANCRO DO PULMÃO DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS EM ESTADIO AVANÇADO**

#### **3.1. Introdução**

O Pembrolizumab, como referido ao longo desta dissertação, é um fármaco muito recente e que foi aprovado para diversas patologias oncológicas, devido aos resultados promissores obtidos em diversos ensaios clínicos, nomeadamente em termos de eficácia e segurança.

O CPNPC é uma das patologias com maior mortalidade a nível mundial (Bray *et al.*, 2018), tendo o pembrolizumab surgido como uma nova terapêutica no combate a esta patologia.

O uso de um fármaco em ensaios clínicos é diferente da utilização do mesmo em prática clínica. Os resultados de determinado fármaco em ambiente de ensaio clínico nem sempre são semelhantes aos obtidos após a sua comercialização, visto que o medicamento em estudo é administrado a doentes com características muito específicas, devido aos critérios de inclusão que os pacientes devem apresentar para integrar esse ensaio clínico. O uso em prática clínica não obedece, na maioria das vezes, a esses critérios, o que pode despoletar diferentes perfis de resposta e segurança relativamente a esse medicamento. Neste sentido, os dados fornecidos pelos diferentes ensaios clínicos sobre o pembrolizumab são de extrema importância, mas poderão não corresponder, na totalidade, aos resultados obtidos após utilização na prática clínica. Assim, a importância do controlo e acompanhamento da eficácia e da segurança do fármaco, depois da sua aprovação, assume particular relevância para a validação da eficácia e segurança verificadas nos ensaios clínicos.

#### **3.2. Desenho e aprovação do estudo**

O estudo realizado neste trabalho define-se como um estudo observacional unicêntrico de dados do mundo real do tratamento com pembrolizumab de doentes previamente tratados,

com cancro do pulmão de células não pequenas em estadio avançado. Não existiu qualquer intervenção ou controlo de uma variável, e o objetivo do mesmo foi avaliar a eficácia e segurança do pembrolizumab comparando os resultados encontrados em prática clínica com os verificados em ensaios clínicos.

Para a sua realização foi necessária a aprovação prévia pela Comissão de Ética do CHUC, de forma a comprovar que o estudo acarretava todas as condições legais e éticas para a realização do mesmo. Em conjunto com a toda a documentação obrigatória para a submissão do projeto foi adicionado o pedido de dispensa de consentimento informado para a recolha de dados relativos a doentes oncológicos para este estudo, com a devida justificação (Anexo 1).

O estudo foi desenhado e submetido na Comissão de Ética do C.H.U.C. de modo a que o conselho ético comprovasse que o mesmo estaria a respeitar os requisitos necessários. O estudo foi aprovado pela mesma no dia oito de abril de dois mil e vinte (08/04/2020), sendo o número identificativo do parecer o CHUC-152-19 (Anexo 2).

O estudo presente foi realizado no C.H.U.C. – Hospital Geral, Serviço de Pneumologia – Hospital de Dia de Pneumologia e a recolha de dados presentes foi realizada num período temporal de 14 meses. Os dados foram recolhidos de diários clínicos, documento que possui informação clínica de um indivíduo em específico inserida pelo médico responsável pelo tratamento e seguimento do mesmo.

A avaliação realizada inclui uma revisão das características demográficas e tumorais dos doentes: idade, género, hábitos tabágicos, PS, estadio e histologia. Todos os doentes incluídos no estudo realizaram pelo menos um ciclo de tratamento com pembrolizumab numa dose fixa de 200 mg a cada três semanas.

### **3.3. Avaliações**

A análise demográfica foi realizada a todos os doentes incluídos neste estudo. A segurança foi monitorizada através da classificação de efeitos adversos, exames físico e testes laboratoriais. A análise de segurança inclui todos os doentes incluídos no estudo.

A informação de eficácia recolhida inclui procedimentos de avaliação objetiva de resposta tumoral, datas de progressão de doença e dados de sobrevivência. A resposta tumoral foi avaliada através dos Critérios de Avaliação de Tumores Sólidos (RECIST) versão 1,1. Relativamente à análise de eficácia, esta foi realizada incluindo todos os doentes elegíveis. A avaliação exploratória realizada nesta análise foi a sobrevivência livre de progressão (SLP). A

SLP foi definida como o tempo desde a data do primeiro tratamento com pembrolizumab até à data da primeira evidência de progressão da doença ou morte (a que ocorrer primeiro).

### 3.4. Análise Estatística

Neste estudo foi realizada a análise estatística dos dados recolhidos, incluindo a tendência central e a dispersão de parâmetros para variáveis quantitativas e frequências absolutas e relativas para variáveis categóricas. As variáveis categóricas foram apresentadas através de números e percentis, medianas e os intervalos foram apresentados para variáveis contínuas.

Para a estimação da SLP, foi realizada uma análise de sobrevivência utilizando o método de Kaplan-Meier com intervalo de confiança (IC) de 95%. A análise de sobrevivência consiste num método estatístico utilizado para analisar dados onde o objeto de interesse é o tempo que decorre até que o acontecimento se verifique. Normalmente o tempo neste tipo de análise é referenciado como tempo até à morte, recidiva ou cura, entre outros parâmetros relacionados. A principal característica deste tipo de análise é a presença de dados censurados, ou seja, a observação parcial da resposta, por exemplo, o acompanhamento perdido de um doente por qualquer razão. A análise de sobrevivência é o único método estatístico que permite analisar dados que obtenham tempos de falha, ao contrário dos restantes métodos que necessitam de toda a informação destes tempos para se conseguir realizar a análise (Colosimo e Giolo, 2006).

Doentes vivos sem progressão foram censurados quando foram perdidos para *follow-up*, sendo que os doentes perdidos para *follow-up* foram censurados quando ocorreu o último contacto.

Doentes que morreram devido a cancro do pulmão antes de ser realizado alguma avaliação de resposta tumoral radiológica foi considerado que tiveram progressão de doença na data de morte.

De forma a avaliar a diferença entre grupos foi realizado o teste de *log-rank*.

Toda a análise estatística foi realizada através do *Software* Estatístico SPSS, versão 21.0.

### 3.5. Objetivos

O pembrolizumab é um fármaco com aprovação relativamente recente no tratamento do CPNPC. O seu uso em ambiente clínico do quotidiano pode apresentar resultados diferentes dos obtidos durante a realização de um ensaio clínico. Assim, o objetivo geral desta dissertação passa pela avaliação dos perfis de segurança e eficácia do pembrolizumab, um anticorpo monoclonal inibidor de *checkpoints* imunitários, através da recolha e análise retrospectiva de

dados obtidos na prática clínica relativos ao tratamento com pembrolizumab de doentes com CPNPC em estadio avançado, comparando-os com a informação similar reportada em ensaios clínicos.

### **3.6. População e Amostra**

Neste estudo foram incluídos 19 doentes com idades igual ou superior a 18 anos, com CPNPC com estadios histologicamente e citologicamente confirmados IIIA, IIIB, e IV que progrediram ou sofreram recorrência depois de um tratamento sistémico para doença metastática avançada.

Todos os doentes que foram incluídos no estudo tiveram de apresentar a PS, de acordo com o ECOG, compreendida entre 0 e 4; um ciclo de quimioterapia completo; função orgânica adequada e uma esperança média de vida superior a 6 semanas; efeitos adversos relacionados com o tratamento anterior resolvidos.

Foram excluídos os doentes que tinham metástases cerebrais ativas, que testaram positivos para hepatite B ou C, que tinham histórico de testar positivo para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), que apresentaram uma doença autoimune severa e doentes que tinham necessidade de tratamento sistémico com corticosteroides (>10 mg diários de prednisolona ou equivalente), ou qualquer outro tratamento imunossupressor.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Características demográficas e do tumor**

Um total de 19 doentes com CPNPC foram incluídos neste estudo. Todos os doentes realizaram pelo menos um ciclo completo de pembrolizumab numa dosagem de 200 mg de 3 em 3 semanas. A mediana da idade no início do tratamento foi de 65 anos (intervalo de idade entre 46 anos e 79 anos), e a média de idade foi de aproximadamente 65 anos.

Dos 19 doentes incluídos no estudo, 15 eram do género masculino (78,95%) e 4 do feminino (21,05%). Relativamente aos hábitos tabágicos da população do estudo verificou-se que a maioria da população era não-fumadora (n=10; 52,63%). O tipo histológico predominante foi o não-escamoso (n=13; 68,42%).

De acordo com ECOG-PS, no início do tratamento, 18 doentes (94,74%) obtiveram uma PS de 0 e apenas 1 doente teve uma PS de 1 (5,26%).

Relativamente ao TPS de PD-L1 dos doentes incluídos, 13 (68,42%) apresentaram um TPS entre 5-50%, enquanto os restantes 6 doentes (31,58%) obtiveram um TPS >50%. A Tabela 5 apresenta, de uma forma compreensiva, a lista de características demográficas e do tumor.

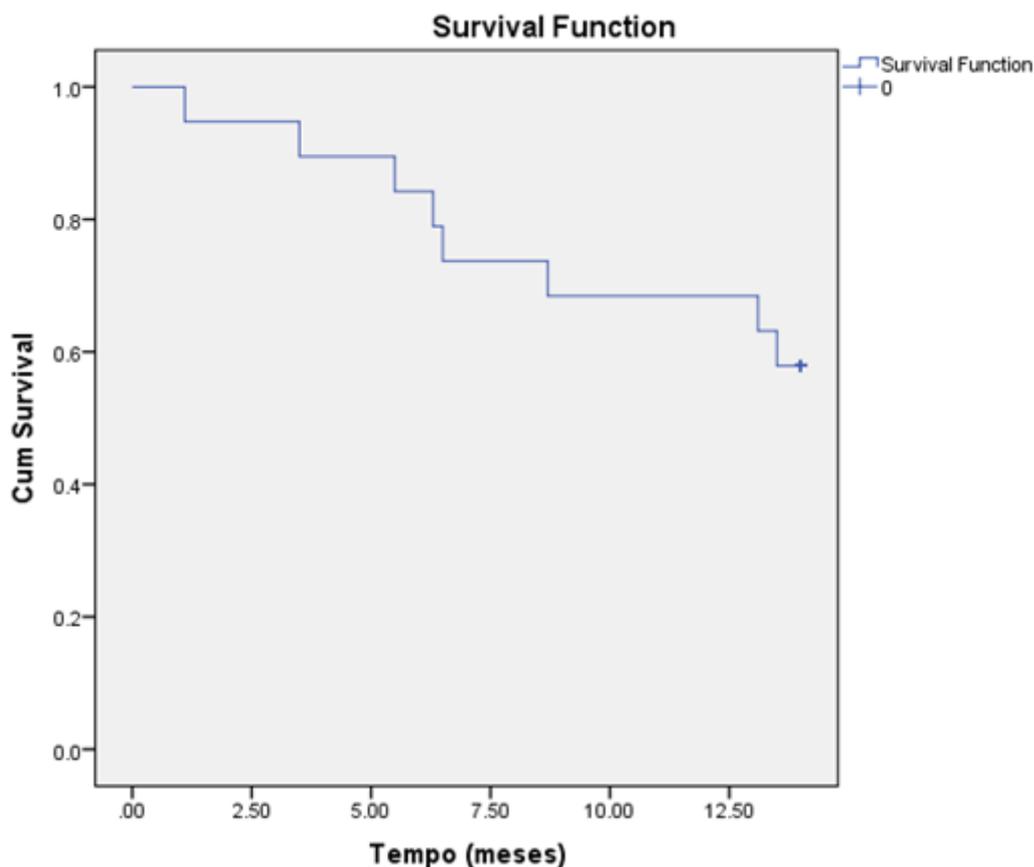
**Tabela 5-** Características demográficas e do tumor (n=19).

<b>Idade (anos)</b>	<b>Média</b>	65 (46- 79)
	<b>Mediana</b>	64,68
		<b>N (%)</b>
<b>Género</b>	<b>Masculino</b>	15 (78,95%)
	<b>Feminino</b>	4 (21,05%)
<b>ECOG performance-status</b>	<b>0</b>	18 (94,74%)
	<b>I</b>	1 (5,26%)
<b>Hábitos Tabágicos</b>		
	<b>Fumador</b>	6 (31,58%)
	<b>Ex-fumador</b>	3 (15,79%)
<b>Estádios</b>	<b>Não-fumador</b>	10 (52,63%)
	<b>IIIa</b>	1 (5,26%)
	<b>IIIb</b>	2 (10,53%)
<b>Histologia</b>	<b>IV</b>	16 (84,21%)
	<b>Não-escamoso</b>	13 (68,42%)
	<b>Escamoso</b>	6 (31,58%)

#### 4.2. Perfil de Eficácia

Dos 19 doentes incluídos no estudo, a melhor resposta global no total da população foi resposta parcial (RP) em 5 doentes (25,32%), doença estável em 5 doentes (25,32%), progressão de doença em 8 doentes (42,11%) e um dos doentes (5,26%) foi perdido para follow-up.

Aquando da análise de sobrevivência, a SLP média foi de 11,17 meses (95% IC,9,26-13,07) na amostra total dos 19 doentes (Figura 9), sendo o número de dados censurados igual a 11 (57,9%).



**Figura 9-** Gráfico da função de sobrevivência e sobrevivência cumulativa

Fonte: SPSS

Foi efetuado um teste de *log-rank* para determinar se existem diferenças na distribuição de sobrevivência entre o grupo de doentes fumadores/ex-fumadores vs não fumadores que se veio a verificar não serem estatisticamente diferentes,  $\chi^2=0,154(1)$ ,  $p=0,695>0,005$ .

Do mesmo modo, também foi efetuado um teste de *log-rank* para determinação de diferenças na distribuição de sobrevivência entre o grupo de doentes com expressão de PDL1 >50% vs PDL1 <50%, que demonstrou não serem estatisticamente diferentes,  $\chi^2=0,212(1)$ ,  $p=0,645>0,005$ .

### 4.3. Perfil de Segurança

No estudo realizado, 14 doentes (73,68%) descontinuaram do estudo. As razões para a descontinuação dos mesmos foram progressão da doença em 8 doentes (42,11%), morte em 6 doentes (31,58%). Dos 19 doentes, 16 tiveram pelo menos um evento adverso de qualquer grau, listados na Tabela 6. As toxicidades mais comuns foram a fadiga/astenia com 15 eventos (15,69%) e edemas, *rash* e dor com 6 eventos cada um, ou seja, 11,76% para cada um dos eventos.

**Tabela 6-** Efeitos adversos relacionados com o tratamento

Eventos adversos	Nº de Eventos (%)
Fadiga	8 (15,69%)
Diarreia/Colite	3 (5,88%)
Anemia	3 (5,88%)
Edema	6 (11,76%)
Dor	6 (11,76%)
Anorexia	5 (9,81%)
Pneumonite	1 (1,97%)
Rash	6 (11,76%)
Other	10 (19,61%)
	Total de eventos (n= 51)

## 5. DISCUSSÃO

A realização deste estudo observacional teve por objetivo avaliar e comparar, através da recolha de informação clínica real ou de prática clínica do mundo real, o perfil de segurança e eficácia da utilização do pembrolizumab em segunda linha no tratamento do CPNPC avançado.

Os ensaios clínicos, tal como descrito previamente, apresentam um grupo muito restrito de doentes. Adicionalmente, todos doentes são seguidos de uma forma muito mais personalizada e pormenorizada comparativamente aos procedimentos realizados em ambiente hospitalar mundialmente, podendo levar a diferenças na eficácia e segurança no medicamento.

O estudo Keynote-010 utilizou pembrolizumab em segunda linha no tratamento do CPNPC em estadio avançado (Herbst *et al.*, 2016). Neste ensaio, verificou-se uma ligeira melhoria da SLP dos grupos tratados com pembrolizumab, principalmente no grupo com uma expressão superior a 50% de PD-L1, que apresentou uma SLP de 4,1 meses, quando comparado com o braço de pembrolizumab em doentes com expressão inferior a 50% de PD-L1, com uma SLP de 5 meses. Já na sobrevivência global apresentou valores com melhorias significativas nos grupos tratados com pembrolizumab, comparativamente ao grupo de quimioterapia clássica, realçando o valor e a mais valia que o pembrolizumab apresenta no tratamento do CPNPC.

No nosso estudo, a SLP média observada nos dados de vida real para doentes com CPNPC em estadio avançado tratados com pembrolizumab foi de 11,17 meses (95% IC,9,26-13,07), superior aos 4,1 meses de SLP reportados no ensaio clínico Keynote-010 (Herbst *et*

*al.*, 2016). A razão para a existência desta diferença entre SLPs poderá estar relacionada com a deteção mais precoce de progressão de doença em ensaio clínico, uma vez que nestes, os exames radiológicos de avaliação de resposta tumoral, como as TACs, são realizados em maior quantidade e em intervalos de tempo mais curtos relativamente aos realizados em prática clínica. Estes factos podem levar à deteção da progressão mais precocemente, principalmente em doentes assintomáticos, levando a uma diminuição dos intervalos de tempo até ocorrer a progressão da doença.

Na análise de subgrupos, doentes fumadores/ex-fumadores vs não fumadores e doentes com expressão de PDLI >50% vs PDLI <50%, no presente estudo demonstrou-se não serem estatisticamente diferentes em termos de distribuição de sobrevivência (SLP). Esperaríamos encontrar diferenças, tal como as reportadas no estudo Keynote-010, onde os doentes que apresentavam um TPS de PD-LI superior a 50% e pertenciam aos braços de tratamento com pembrolizumab, obtiveram resultados significativamente melhores relativamente aqueles que apresentaram uma expressão de PD-LI inferior a 50% (Herbst *et al.*, 2016). Uma possível razão para a falta de relação entre estes fatores, expressão de PD-LI e hábitos tabágicos, poderá estar seguramente relacionada com o facto de se tratar de uma amostra de dimensões reduzidas.

Não foi realizada análise de sobrevivência global porque, para isso, e baseado no número de mortes descrito de 6 (31,58%), o seguimento dos doentes teria de ser superior a 14 meses.

Num estudo de dados de vida real com imunoterapia (Figueiredo *et al.*, 2020), os autores verificaram que o PS dos doentes demonstrou ser a variável mais importante relacionada com a sobrevivência, tendo demonstrado uma correlação negativa em ambas as análises, univariada e multivariada. No nosso estudo, foi demonstrado não haver uma correlação negativa entre a idade dos doentes e a sobrevivência global, o que significa que os doentes com mais idade e com um bom PS beneficiariam igualmente da imunoterapia, tal como os doentes com idade inferior e igual PS.

Seria muito relevante, futuramente, realizar-se uma análise da correlação destes dois fatores, PS e idade, sendo crucial o aumento do número de doentes da nossa amostra, tal como o tempo de seguimento.

Em relação ao perfil de segurança, o pembrolizumab demonstrou ser bem tolerado, apresentando um bom perfil de segurança, tendo os efeitos adversos observados sido consistentes com os reportados em ensaios clínicos, onde os mesmos foram registados em baixo número e associados a poucas complicações, comparativamente aos perfis de efeitos adversos reportados no tratamento com quimioterapia. Assim, com a realização deste estudo foi também visível a boa tolerância e baixa toxicidade deste fármaco.

## **6. CONCLUSÃO**

Com a realização deste estudo demonstrou-se um benefício clínico de sobrevivência significativo em doentes tratados com pembrolizumab em segunda linha, com um perfil de segurança favorável quando administrado em contexto de vida real. Estes resultados diferem dos resultados apresentados no estudo Keynote-010, apesar de ambos demonstrarem um benefício clínico. Estas diferenças, seguramente estarão relacionadas com o facto dos ensaios clínicos possuírem características restritivas e distintas da prática clínica em contexto de vida real.

Apesar de se tratar de uma amostra de pequenas dimensões, estes dados de vida real são clinicamente relevantes e sustentam o uso de pembrolizumab como uma opção de tratamento para doentes com CPNPC avançado, cuja doença progrediu após quimioterapia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, Maura; USTOYEV, Yelena - Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. **Seminars in Oncology Nursing**. . ISSN 07492081. 35:5 (2019) 1–5. doi: 10.1016/j.soncn.2019.08.002.

AGENCY, European Medicines - **Keytruda (pembrolizumab): An overview of Keytruda and why it is authorised in the EU** Disponível em [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/keytruda-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/keytruda-epar-medicine-overview_en.pdf)

ARAÚJO, António *et al.* - **Recomendações nacionais para diagnóstico e tratamento do cancro do pulmão**

AURISICCHIO, Luigi; CILIBERTO, Gennaro - Genetic cancer vaccines: Current status and perspectives. **Expert Opinion on Biological Therapy**. . ISSN 14712598. 12:8 (2012) 1043–1058. doi: 10.1517/14712598.2012.689279.

BANCHEREAU, Jacques; PALUCKA, A. Karolina - Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. **Nature Reviews Immunology**. . ISSN 14741733. 5:4 (2005) 296–306. doi: 10.1038/nri1592.

BANCHEREAU, Jacques; STEINMAN, Ralph M. - Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**. . ISSN 00280836. 392:6673 (1998) 245–252. doi: 10.1038/32588.

BAXI, Shrujal *et al.* - Immune-related adverse events for anti-PD-1 and anti-PD-L1 drugs: systematic review and meta-analysis. **The British Medical Journal**. (2018) 2–8. doi: 10.1136/bmj.k793.

BERRAONDO, Pedro *et al.* - Cytokines in clinical cancer immunotherapy. **British Journal of Cancer**. . ISSN 15321827. 120:1 (2019) 6–15. doi: 10.1038/s41416-018-0328-y.

BOYSE, Edward A; Lloyd J. Old - Immunology of Experimental Tumors. **Annual Reviews**. 15: (1964) 167–187.

BRAY, Freddie *et al.* - Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **A Cancer Journal for Clinicians**. . ISSN 1542-4863. 68:6 (2018) 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.

CAVANAGH, Mary; Emily G. Findla. - **T-cell activation**. London : [s.n.]

CHEN, Daniel S.; MELLMAN, Ira - Elements of cancer immunity and the cancer-immune set

point. **Nature**. . ISSN 14764687. 541:7637 (2017) 321–330. doi: 10.1038/nature21349.

CHEN, Lieping; FLIES, Dallas B. - Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. **Nature Reviews Immunology**. . ISSN 14741733. 13:4 (2013) 227–242. doi: 10.1038/nri3405.

CHENG, Ting Yuan David *et al.* - The international epidemiology of lung cancer: Latest trends, disparities, and tumor characteristics. **Journal of Thoracic Oncology**. . ISSN 15561380. 11:10 (2016) 1653–1671. doi: 10.1016/j.jtho.2016.05.021.

COKKINIDES, V. *et al.* - Progress and Opportunities in Tobacco Control. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. . ISSN 0007-9235. 56:3 (2006) 135–142. doi: 10.3322/canjclin.56.3.135.

COLOSIMO, Enrico Antônio; GIOLO, Suely Ruiz - **ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA APLICADA**. 1ª ed. São Paulo : Edgar Blucher, (2006). ISBN 9788535220506.

COOPER, Wendy A. *et al.* - Molecular biology of lung cancer. **Journal of Thoracic Disease**. 5:2013) 483–489. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.03.

CORTÉS, Ángel Artal; URQUIZU, Lourdes Calera; CUBERO, Jorge Hernando - Adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer: State-of-the-art. **Translational Lung Cancer Research**. . ISSN 22264477. 4:2 (2015) 191–197. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2014.06.01.

CREE, Ian A. - Cancer Biology. **Cancer Cell Culture: Methods and Protocols, Second Edition, Methods in Molecular Biology**. 731:(2011) 1–10.

CRINÒ, L. *et al.* - Early stage and locally advanced (non-metastatic) non-small-cell lung cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**. . ISSN 09237534. 21:SUPPL. 5 (2010) 103–115. doi: 10.1093/annonc/mdq207.

DARVIN, Pramod *et al.* - Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. **Experimental and Molecular Medicine**. . ISSN 20926413. 50:12 (2018) 1–11. doi: 10.1038/s12276-018-0191-1.

DETTERBECK, Frank C. *et al.* - The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. **Chest**. . ISSN 19313543. 151:1 (2016) 193–203. doi: 10.1016/j.chest.2016.10.010.

DISIS, Mary L. - Immune regulation of cancer. **Journal of Clinical Oncology**. . ISSN 0732183X. 28:29 (2010) 4531–4538. doi: 10.1200/JCO.2009.27.2146.

DISIS, Mary L. - Mechanism of action of immunotherapy. **Seminars in Oncology**. . ISSN

15328708. 41:S5 (2014) S3–S13. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.09.004.

DUDLEY, Mark E. *et al.* - Generation of Tumor-Infiltrating Lymphocyte Cultures for Use in Adoptive Transfer Therapy for Melanoma Patients. **Journal of Immunotherapy**. . ISSN 15374513. 26:4 (2003) 332–342. doi: 10.1097/00002371-200307000-00005.

FIDLER, Miranda M.; BRAY, Freddie; SOERJOMATARAM, Isabelle - The global cancer burden and human development: A review. **Scandinavian Journal of Public Health**. . ISSN 16511905. 46:1 (2018) 27–36. doi: 10.1177/1403494817715400.

FIGUEIREDO, A. *et al.* - Real-world data from the Portuguese Nivolumab Expanded Access Program (EAP) in previously treated Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC). **Pulmonology**. . ISSN 25310437. 26:1 (2020) 10–17. doi: 10.1016/j.pulmoe.2019.06.001.

FINN, O. J. - Immuno-oncology: Understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. **Annals of Oncology**. . ISSN 09237534. 23:SUPPL.8 (2012) 8–11. doi: 10.1093/annonc/mds256.

FRANKENBERGER, Bernhard; SCHENDEL, Dolores J. - Third generation dendritic cell vaccines for tumor immunotherapy. **European Journal of Cell Biology**. . ISSN 01719335. 91:1 (2012) 53–58. doi: 10.1016/j.ejcb.2011.01.012.

GARON, Edward B. *et al.* - Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. **New England Journal of Medicine**. . ISSN 15334406. 372:21 (2015) 2018–2028. doi: 10.1056/NEJMoa1501824.

GASPARRI, Maria Luisa *et al.* - The Immunobiology of Cancer: From Tumor Escape to Cancer Immunoediting Towards Immunotherapy in Gynecologic Oncology. **Molecular Oncology: Underlying Mechanisms and Translational Advancements**. 2017) 193–204. doi: 10.1007/978-3-319-53082-6.

GOETZ, Laura H.; SCHORK, Nicholas J. - Personalized medicine: motivation, challenges, and progress. **Fertility and Sterility**. . ISSN 15565653. 109:6 (2018) 952–963. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.05.006.

GOLDSTRAW, Peter - **Staging Manual in Thoracic Oncology**. 7th. ed. Denver : Editorial Rx Press, 2009. ISBN 9780979927447.

GUO, Chunqing *et al.* - Therapeutic cancer vaccines. Past, present, and future. Em KENNETH D. TEW, PAUL B. FISHER (Ed.) - **Advances in Cancer Research** 1. ed. [S.l.] : Elsevier Inc., 2013 Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407190-2.00007-1>. ISBN

9780124071902v. 119. p. 421–475.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. - Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**. . ISSN 00928674. 144:5 (2011) 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

HERBST, Roy S. *et al.* - Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. **The Lancet**. . ISSN 1474547X. 387:10027 (2016) 1540–1550. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01281-7.

HERBST, Roy S.; MORGENZTERN, Daniel; BOSHOFF, Chris - The biology and management of non-small cell lung cancer. **Nature**. . ISSN 14764687. 553:7689 (2018) 446–454. doi: 10.1038/nature25183.

INAMURA, Kentaro - Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. **Frontiers in Oncology**. . ISSN 2234943X. 7:2017) 1–7. doi: 10.3389/fonc.2017.00193.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - **Latest global cancer data**  
Lyon : [s.n.] Disponível em <http://gco.iarc.fr/>

JENSEN, Shawn M. *et al.* - Signaling through OX40 enhances antitumor immunity. **Seminars in Oncology**. . ISSN 00937754. 37:5 (2010) 524–532. doi: 10.1053/j.seminoncol.2010.09.013.

JHA, Prabhat *et al.* - 21st-century hazards of smoking and benefits of cessation in the United States. **New England Journal of Medicine**. . ISSN 15334406. 368:4 (2013) 341–350. doi: 10.1056/NEJMs1211128.

JÖNSSON, Bengt *et al.* - The cost and burden of cancer in the European Union 1995–2014. **European Journal of Cancer**. . ISSN 18790852. 66:(2016) 162–170. doi: 10.1016/j.ejca.2016.06.022.

KAMBAYASHI, Yumi *et al.* - Biomarkers for Predicting Efficacies of Anti-PD1 Antibodies. **Frontiers in Medicine**. . ISSN 2296858X. 6:2019) 1–6. doi: 10.3389/fmed.2019.00174.

KEIR, Mary E. *et al.* - PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annual Review of Immunology**. . ISSN 07320582. 26:2008) 677–704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.

KNIGHT, Sean Blandin *et al.* - Progress and prospects of early detection in lung cancer. **Open Biology**. . ISSN 20462441. 7:9 (2017). doi: 10.1098/rsob.170070.

- KWOK, Gerry *et al.* - Pembrolizumab (Keytruda). **Human Vaccines & Immunotherapeutics**. 5515: (2016) 1–50. doi: 10.1080/21645515.2016.1199310.
- LOLLINI, Pier Luigi *et al.* - Vaccines for tumour prevention. **Nature Reviews Cancer**. . ISSN 1474175X. 6:3 (2006) 204–216. doi: 10.1038/nrc1815.
- LUENGO-FERNANDEZ, Ramon *et al.* - Economic burden of cancer across the European Union: A population-based cost analysis. **The Lancet Oncology**. . ISSN 14702045. 14:12 (2013) 1165–1174. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70442-X.
- LYNCH, David H. - The promise of 4-1BB (CD137)-mediated immunomodulation and the immunotherapy of cancer. **Immunological Reviews**. . ISSN 01052896. 222:1 (2008) 277–286. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00621.x.
- MADDEN, Kathleen; KASLER, Mary Kate - Immune Checkpoint Inhibitors in Lung Cancer and Melanoma. **Seminars in Oncology Nursing**. . ISSN 07492081. 35:5 (2019) 1–7. doi: 10.1016/j.soncn.2019.08.011.
- MELLSTEDT, Håkan; VANSTEENKISTE, Johan; THATCHER, Nick - Vaccines for the treatment of non-small cell lung cancer: Investigational approaches and clinical experience. **Lung Cancer**. . ISSN 01695002. 73:1 (2011) 11–17. doi: 10.1016/j.lungcan.2011.02.023.
- MEMON, Humera; PATEL, Bhoomika M. - Immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer: A bird's eye view. **Life Sciences**. . ISSN 18790631. 233:(2019) 1–16. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116713.
- MET, Özcan *et al.* - Principles of adoptive T cell therapy in cancer. **Seminars in Immunopathology**. . ISSN 18632300. 41:1 (2019) 49–58. doi: 10.1007/s00281-018-0703-z.
- MOK, Tony S. K. *et al.* - Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. **The Lancet**. . ISSN 1474547X. 393:10183 (2019) 1819–1830. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32409-7.
- NEEK, Medea; KIM, Tae Il; WANG, Szu Wen - Protein-based nanoparticles in cancer vaccine development. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. . ISSN 15499642. 15:1 (2019) 164–174. doi: 10.1016/j.nano.2018.09.004.
- NORBURY, Christopher C.; SIGAL, Luis J. - Cross priming or direct priming: is that really the question? **Current Opinion in Immunology**. 15:(2003) 82–88. doi: 10.1016/S0952-7915(02)00003-1.

NOVELLINO, Luisa; CASTELLI, Chiara; PARMIANI, Giorgio - A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. **Cancer Immunology, Immunotherapy**. . ISSN 03407004. 54:3 (2005) 187–207. doi: 10.1007/s00262-004-0560-6.

O'NEILL, Rachel E.; CAO, Xuefang - Co-stimulatory and co-inhibitory pathways in cancer immunotherapy. **Advances in Cancer Research**. . ISSN 21625557. 143:(2019) 145–194. doi: 10.1016/bs.acr.2019.03.003.

PARMIANI, Giorgio *et al.* - Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: What have we achieved? Where are we going? **Journal of the National Cancer Institute**. . ISSN 00278874. 94:11 (2002) 805–818. doi: 10.1093/jnci/94.11.805.

PAZ-ARES, L. *et al.* - Pembrolizumab plus chemotherapy for squamous non-small-cell lung cancer. **New England Journal of Medicine**. . ISSN 15334406. 379:21 (2018) 2040–2051. doi: 10.1056/NEJMoa1810865.

PLANCHARD, D. *et al.* - Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**. . ISSN 15698041. 29:Supplement 4 (2018) iv192–iv237. doi: 10.1093/annonc/mdy275.

POSTMUS, P. E. *et al.* - Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**. . ISSN 15698041. 28:Supplement 4 (2017) 1–21. doi: 10.1093/annonc/mdx222.

RECK, Martin *et al.* - Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. **New England Journal of Medicine**. . ISSN 0028-4793. 375:19 (2016) 1823–1833. doi: 10.1056/nejmoa1606774.

RIZVI, Naiyer A. *et al.* - Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. **Science**. . ISSN 10959203. 348:6230 (2015) 124–128. doi: 10.1126/science.12348.

ROBINSON, Dan R. *et al.* - Integrative clinical genomics of metastatic cancer. **Nature**. . ISSN 14764687. 548:7667 (2017) 297–303. doi: 10.1038/nature23306.

ROSHANRAVAN, Behzad; HALLIDAY, Neil; SANSOM, David M. - CTLA-4: A moving target in immunotherapy. **Blood**. . ISSN 15280020. 131:1 (2017) 58–67. doi: 10.1182/blood-2017-06-741033.

ROY S. HERBS, John V. Heymach And Scott M. Lippman - Lung cancer. **The New England Journal of Medicine**. (2006) 1–169. doi: 10.1017/CBO9780511545351.

- SAIKA, Kumiko; MACHII, Ryoko - Cancer mortality attributable to tobacco by region based on the who global report. **Japanese Journal of Clinical Oncology**. . ISSN 03682811. 42:8 (2012) 771–772. doi: 10.1093/jjco/hys117.
- SCHREIBER, Robert D.; OLD, Lloyd J.; SMYTH, Mark J. - Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**. . ISSN 00368075. 331:6024 (2011) 1565–1570. doi: 10.1126/science.1203486.
- SCHUMACHER, Ton N.; SCHREIBER, Robert D. - Neoantigens in cancer immunotherapy. **Science**. . ISSN 10959203. 348:6230 (2015) 69–74. doi: 10.1126/science.aaa4971.
- SHANKARAN, Vijay *et al.* - IFN $\gamma$ , and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature**. . ISSN 00280836. 410:6832 (2001) 1107–1111. doi: 10.1038/35074122.
- SHOWALTER, Anne *et al.* - Cytokines in immunogenic cell death: Applications for cancer immunotherapy. **Cytokine**. . ISSN 10960023. 97:(2017) 123–132. doi: 10.1016/j.cyto.2017.05.024.
- STOLINA, Morina *et al.* - Intratumoral administration of adenoviral interleukin 7 gene-modified dendritic cells augments specific antitumor immunity and achieves tumor eradication. **Human Gene Therapy**. . ISSN 10430342. 11:1 (2000) 53–65. doi: 10.1089/10430340050016157.
- TOPALIAN, Suzanne L. *et al.* - Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**. . ISSN 14741768. 16:5 (2016) 275–287. doi: 10.1038/nrc.2016.36.
- TORRE, Lindsey A. *et al.* - Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. . ISSN 1542-4863. 65:2 (2015) 87–108. doi: 10.3322/caac.21262.
- TRAVIS, William D. *et al.* - International Association for the Study of Lung Cancer/ American Thoracic Society/European Respiratory Society: International multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma - An executive summary. **Proceedings of the American Thoracic Society**. . ISSN 15463222. 8:5 (2011) 381–385. doi: 10.1513/pats.201107-042ST.
- TRAVIS, William D. *et al.* - The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. **Journal of Thoracic Oncology**. . ISSN 15561380. 10:9 (2015) 1243–1260. doi: 10.1097/JTO.0000000000000630.
- TRAVIS, William D. *et al.* - **WHO classification of Tumours of the Lung, Pleura,**

**Thymus and Heart.** 4<sup>a</sup> ed. Lyon : International Agency for Research on Cancer (IARC), (2015). ISBN 9789283224365.

URBA, Walter J. *et al.* - Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. **New England Journal of Medicine.** . ISSN 15334406. 363:8 (2010) 1311–1320. doi: 10.1056/NEJMoa1516783.

WANG, Manni *et al.* - Safety and efficacy profile of pembrolizumab in solid cancer: Pooled reanalysis based on randomized controlled trials. **Dovepress.** . ISSN 11778881. 11:(2017) 2851–2860. doi: 10.2147/DDDT.S146286.

WHO - Health statistics and information systems. **Metrics: Disability-Adjusted Life Year (DALY).** 0:(2012) 2–3.

WINKLER, Volker *et al.* - Smoking prevalence and its impacts on lung cancer mortality in Sub-Saharan Africa: An epidemiological study. **Preventive Medicine.** . ISSN 00917435. 57:5 (2013) 634–640. doi: 10.1016/j.ypmed.2013.08.022.

YEE, Cassian - Adoptive T cell therapy: points to consider. **Current Opinion in Immunology.** . ISSN 18790372. 51:(2018) 197–203. doi: 10.1016/j.coi.2018.04.007.

YOULDEN, Danny R.; CRAMB, Susanna M.; BAADE, Peter D. - The international epidemiology of lung cancer: Geographical distribution and secular trends. **Journal of Thoracic Oncology.** . ISSN 15561380. 3:8 (2008) 819–831. doi: 10.1097/JTO.0b013e31818020eb.

ZHANG, Qianxia; VIGNALI, Dario A. A. - Co-stimulatory and Co-inhibitory Pathways in Autoimmunity. **Immunity.** . ISSN 10974180. 44:5 (2016) 1034–1051. doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.017.

ZHANG, Tengfei *et al.* - The efficacy and safety of anti-PD-1/PD-L1 antibodies for treatment of advanced or refractory cancers: A meta-analysis. **Oncotarget.** . ISSN 19492553. 7:45 (2016) 73068–73079. doi: 10.18632/oncotarget.12230.

ZUGAZAGOITIA, Jon *et al.* - The new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification from a clinical perspective: Current concepts and future prospects. **Journal of Thoracic Disease.** . ISSN 20776624. 6:(2014) S526–S536. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.01.27.

# ANEXOS

- Anexo I – Parecer da Comissão de Ética do C.H.U.C – Parte I



**SNS** SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE



UNIDADE DE INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO

9.13

*Handwritten notes:*  
 A CA  
 8/4/2020

Exmo Senhor  
 Prof. Doutor Fernando Regateiro  
 Presidente do Conselho de  
 Administração  
 Centro Hospitalar e Universitário de  
 Coimbra, EPE

Prof. Doutor Fernando J. Regateiro  
 Presidente do Conselho de Administração

SUA REFERÊNCIA	SUA COMUNICAÇÃO DE	NOSSA REFERÊNCIA	DATA
		CHUC-152-19	02-03-2020

**ASSUNTO:** Aprovação do Projecto de Investigação CHUC-152-19

A pedido de **Ricardo Antunes Portugal**, recebeu esta Unidade um pedido de autorização de um Projecto de Investigação sobre **"Estudo Observacional, retrospectivo e unicêntrico, de dados mundo real do tratamento com pembrolizumab de doentes previamente tratados, com cancro de pulmão de células não-pequenas em estdio avançado."** ao qual não se aplicam as normas previstas na Lei n.º 21/2014 de 16 de Abril e colheu parecer **Favorável** da Comissão de Ética deste Hospital.

Informa-se V. Ex.ª que este projecto não acarreta qualquer encargo financeiro adicional para o CHUC.

Solicita-se assim a autorização do Conselho de Administração para este Projecto.

Com os mais respeitosos cumprimentos,

PI'A Coordenadora da Unidade de Inovação e Desenvolvimento

Sci-l. Cunha  
 (Prof. Doutor José Saraiva da Cunha)

CHUC, em Conselho de Administração

*Autenticado*  
 16/04/2020

Prof. Doutor Fernando J. Regateiro	<i>FR</i>
Dr. João Maria Costa	<i>LM</i>
Dr. Joaquim Paulo de Fátima	<i>JK</i>
Dr. António Costa	<i>AC</i>

CHUC, - EPE  
 CONSELHO DE ADMINISTRAÇÃO  
 Reg. n.º *2253* *POA*  
 Origem  
 Data *6/4/2020*

- Anexo 2 – Parecer da Comissão Ética do C.H.U.C – Parte II



SNS SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE



### Comissão de Ética para a Saúde

Visto/ À U.I.D.  
para difusão

Exmo. Senhor  
Dr. Francisco Parente  
Digmº Diretor Clínico do CHUC

*Dr. Francisco Parente*  
Diretor Clínico  
C.H.U.C. - SAÚDE  
27/02/2020

SUA REFERÊNCIA	SUA COMUNICAÇÃO DE	NOSSA REFERÊNCIA	DATA
		N.º 036/CES	27-02-2020
		Proc. N.º <b>CHUC-152-19</b>	

**ASSUNTO:** Estudo Observacional: Retrospetivo – “**DADOS DO MUNDO REAL DO TRATAMENTO COM PEMBROLIZUMAB DE DOENTES PREVIAMENTE TRATADOS, COM CANCRO DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO-PEQUENAS EM ESTADIO AVANÇADO**”

**Entrada na CES:** 07-01-2020

**Visto na Reunião de:** 23-01-2020 (**Parecer Desfavorável, Ofº 014/20**)

**Reentrada na CES:** 11-02-2020

**Investigador/a/es:** Ricardo Antunes Portugal, Estudante de Mestrado da Faculdade de Farmácia - UC Co-

**Investigadores:** Joana Isabel Fonseca Dias Da Silva, Coordenadora de Ensaios Clínicos, Serviço de

Pneumologia; Maria Teresa da Teixeira Cruz Rosete, Profª Assistente Faculdade de Farmácia - UC

**Serviço de Realização:** Pneumologia

Cumprir informar Vossa Ex.ª que a CES - Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, reunida em 26 de fevereiro de 2020, considera que se encontram respeitados os requisitos éticos adequados à realização do estudo pelo que emite parecer favorável ao seu desenvolvimento no CHUC. Considerando as características do estudo é dispensado o Consentimento Informado

Mais se informa que a CES do CHUC deverá ser semestralmente atualizada em relação ao desenvolvimento dos estudos favoravelmente analisados e informada da data da conclusão dos mesmos, com envio de relatório final.

Com os melhores cumprimentos,

A Comissão de Ética para a Saúde do CHUC, E.P.E.

*João Pedroso de Lima*  
Prof. Doutor João Pedroso de Lima  
Presidente

CES do CHUC: Prof. Doutor João Pedroso de Lima, Prof. Doutora Margarida Silvestre, Enfª Adélio Tinoco Mendes, Dra. Cláudia Santos, Dra. Isabel Ventura, Dr. José António Feio, Rev. Pe. Doutor Nuno dos Santos, Dr. Pedro Lopes, Dra. Teresa Monteiro