



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

LAURA SOARES RAMOS

TERAPÊUTICA NEOADJUVANTE DO MELANOMA

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE DERMATOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:
PROFESSOR DOUTOR RICARDO JOSÉ DAVID COSTA VIEIRA

NOVEMBRO/2020

Terapêutica neoadjuvante do melanoma

Artigo de revisão

Laura Soares Ramos

Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

Endereço de e-mail: ramos.52872@gmail.com

Índice

Lista de abreviaturas _____	3
Resumo _____	4
Abstract _____	5
Introdução _____	6
Materiais e Métodos _____	9
Desenvolvimento _____	10
1. Conceito de neoadjuvante _____	10
2. Abordagem neoadjuvante antes das novas terapêuticas _____	12
2.1. Quimioterapia _____	12
2.2. Bioquimioterapia _____	12
2.3. Interferão alfa _____	14
3. Imunoterapia neoadjuvante _____	16
3.1. Inibidores de CTLA-4 _____	17
3.2. Inibidores de PD-1 _____	19
4. Terapia dirigida neoadjuvante _____	24
5. Outras terapêuticas com potencial uso neoadjuvante _____	27
Discussão e Conclusão _____	31
Agradecimentos _____	34
Referências bibliográficas _____	35

Lista de abreviaturas

AJCC - American Joint Committee on Cancer
B2M - β -2 microglobulin
CTLA-4 - Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4
DAMP - Damage-associated molecular pattern
EFS - Event-free survival
EMA - European Medicines Agency
ERK - Extracellular signal-regulated kinase
ESMO - European Society for Medical Oncology
GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Grb2 - Growth factor receptor-bound protein 2
HDI - High dose of interferon- α
HSV-1 - Herpes simplex virus 1
IFN - Interferon
IL - Interleukin
ISTM - Immunoreceptor tyrosine-based switch motif
LAG-3 - Lymphocyte-activation gene 3
MAPK - Mitogen-activated protein kinase
MEK - MAPK extracellular receptor kinase
MHC - Major histocompatibility complex
MTIC - 3-methyl-[triazen-1-yl]-imidazole-4-carboxamide
OS - Overall survival
P56Lck - Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
PAMP - Pathogen-associated molecular pattern
pCR - Pathologic complete response
PD-1 - Programmed cell death protein-1
PFS - Progression-free survival
PI3K - Phosphatidylinositol-3-kinase
RFS - Relapse-free survival
RTK - Receptor tyrosine kinase
SHP-2 - Src homology region 2 domain-containing phosphatase 2
TCR - T-cell receptor
TEX - Exhausted T lymphocytes
TIGIT - T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIM-3 - T-cell immunoglobulin and mucin- domain containing-3
TNF - Tumor necrosis factor
T-VEC - Talimogene laherparepvec

Resumo

O melanoma cutâneo é o tumor cutâneo com maior taxa de mortalidade. De facto, o diagnóstico de doença localmente avançada está associado a pior prognóstico, com elevadas taxas de recorrência, mesmo perante a aplicação do tratamento preconizado. A introdução de terapêutica neoadjuvante poderá não só melhorar a abordagem cirúrgica, tida como curativa, como também traduzir-se em benefício para a sobrevivência destes doentes.

A fim de perceber quais as terapêuticas que têm vindo a ser estudadas na abordagem neoadjuvante e o seu impacto no prognóstico, procedeu-se à revisão da literatura relevante, disponível nas bases de dados *Pubmed* e *Web of Science*, de 2015 a 2020.

É evidente o desenvolvimento da terapia neoadjuvante. Iniciou-se pelo estudo da quimioterapia, da bioquimioterapia e pela utilização de doses elevadas de interferão α . A identificação de potenciais alvos moleculares terapêuticos fez considerar novas terapêuticas, como a imunoterapia (baseada na inibição de *checkpoints* CTLA-4 e PD-1) e a terapia dirigida (nos melanomas com gene BRAF mutado). Verificou-se existir uma melhoria na sobrevivência dos doentes com melanoma localmente avançado possivelmente ressecável, especialmente com a utilização das novas terapêuticas. No entanto, a evidência disponível ainda não é suficiente para a definição de um regime terapêutico neoadjuvante efetivo e seguro.

Palavras-chave

Melanoma, neoadjuvante, (bio)quimioterapia, IFN- α , imunoterapia, terapia dirigida

Abstract

Cutaneous melanoma has the highest mortality rate of skin cancers. In fact, the diagnosis of locally advanced melanoma is associated with worse prognosis and with high recurrence rates, even after recommended treatment. The introduction of neoadjuvant therapy might improve surgical approach, regarded as curative, and translate into benefit for those patient's survival.

To understand which therapies have been studied for neoadjuvant approach and their impact on prognosis, the available relevant literature on *Pubmed* and *Web of Science*, from 2015 to 2020, was reviewed.

It is clear the development of neoadjuvant therapies. It began on chemotherapy, biochemotherapy and high doses of interferon α . The identification of potential therapeutic molecular targets did consider new therapies, such as immunotherapy (based on inhibition of CTLA-4 and PD-1 checkpoints) and target therapy (for BRAF-mutated melanoma). There was an improvement in patient's survival with resectable stage III melanoma, especially with the new therapies. However, the available evidence is still not enough to define an effective and safe neoadjuvant therapeutic regimen.

Keywords

Melanoma, neoadjuvant, (bio)chemotherapy, IFN- α , immunotherapy, target therapy

Introdução

O melanoma cutâneo é uma neoplasia maligna derivada de melanócitos e é considerado o mais agressivo dos tumores cutâneos, sendo responsável por 90% da mortalidade associada a estes tumores, [1] apesar de ser o menos frequente (contabilizando apenas 2%). [2] Ainda assim, a sua incidência tem aumentado em todo o mundo, registando-se maiores valores de incidência na Austrália (50-60/100000) e menores na Europa (geralmente inferiores a 10-25/100000). [1] Este tumor apresenta um pico de incidência aos 65 anos, embora possa ocorrer em qualquer idade. Tem-se ainda verificado uma estabilização na mortalidade associada, com exceção da que se verifica em homens mais velhos. [3]

Ainda assim, cerca de 90% dos melanomas são diagnosticados como tumores primários não metastizados, o que lhes confere um prognóstico favorável. [1] Nestes casos, o prognóstico é influenciado pela espessura do tumor (também designada por profundidade de Breslow), pela presença de ulceração e pelo índice mitótico (que está ainda relacionado com o aumento do risco de metastização associada ao gânglio sentinela). [1,4]

A AJCC8 estratifica o melanoma cutâneo em quatro estádios principais. [4] O estádio I é o de melhor prognóstico, com uma sobrevivência específica a 5 anos de 98% e a 10 anos de 95%. Já o estádio II apresenta uma sobrevivência a 5 anos de 90% e a 10 anos de 84%. Em ambos os estádios, o prognóstico é definido pelas características do tumor primitivo (profundidade de Breslow e presença de ulceração), na ausência de doença ganglionar ou metastática. [4] O estádio III apresenta uma sobrevivência específica a 5 anos de 77% e a 10 anos de 69%. Este estádio é bastante heterogéneo, pois representa uma grande variedade de doentes – estão incluídos doentes com doença ganglionar clinicamente oculta (isto é, identificada apenas na biópsia do gânglio sentinela, sem deteção clínica ou imagiológica de metastização ganglionar), doentes com doença ganglionar clinicamente evidente e doentes com metastização locorregional não ganglionar (ou seja, metastização microsatélite, satélite ou em trânsito). Tendo sido demonstrados piores valores de sobrevivência nos doentes com envolvimento ganglionar clinicamente evidente (quando comparados com os de envolvimento ganglionar clinicamente oculto) e nos casos de metastização locorregional não ganglionar, este terceiro estádio traduz-se por um amplo intervalo prognóstico, com uma sobrevivência específica a 5 anos de 93% no estádio IIIA até 32% no estádio IIID. [4] O estádio IV é o de pior prognóstico, cujo melhor valor de sobrevivência específica a 1 ano (de 62%) ocorre na presença de metastização cutânea, subcutânea ou ganglionar sem atingimento visceral. [5]

Nas situações de doença localizada (sem doença ganglionar), a ESMO preconiza a excisão local alargada do tumor primário, segundo margens de segurança que variam de acordo com a espessura tumoral e a preservação funcional. [3] Contudo, para estádios iguais ou superiores a pT2a – tumores cuja espessura seja superior a 1.0mm – é recomendada a

biópsia do gânglio sentinela (I, A). Aos doentes com doença de estágio imediatamente inferior (pT1b – tumores com espessura superior a 0.8mm e inferior a 1.0mm ou espessura inferior a 0.8mm e ulcerados), a biópsia do gânglio sentinela deve ser discutida com o doente (III, B). [6] A biópsia do gânglio sentinela fornece informação adicional para o estadiamento tumoral, auxiliando na gestão clínica posterior do doente. Desta forma, o tratamento dos doentes com doença locorregional (estádio III) passa pela ressecção cirúrgica (excisional) do tumor primário e das metástases satélites ou em trânsito ressecáveis, disseção ganglionar e terapia adjuvante nos casos selecionados. [3,6] Como terapêuticas adjuvantes, a ESMO recomenda (I, A) a utilização de inibidores de PD-1 (nivolumab ou pembrolizumab) ou da associação dabrafenib e trametinib (na presença do gene BRAF mutado), já aprovados pela EMA. [3] Este grupo de doentes, apesar de se apresentar com doença possivelmente ressecável, evidencia um elevado risco de recorrência regional e sistémica, que pode chegar aos 70% nos casos de doença ganglionar clinicamente evidente, se apenas for utilizada a abordagem cirúrgica. Ainda assim, mesmo com o tratamento adjuvante, o risco de recorrência permanece elevado. [7,8] São, por isso, considerados melanomas de alto risco e representam cerca de 10 a 20% de todos os melanomas. [7,9] No tratamento da doença irressecável e metastizada recorre-se à terapêutica sistémica, que pode ser complementada por abordagens potencialmente favorecedoras de controlo da doença a longo prazo, como a cirurgia ou a radiocirurgia estereotáxica, nos casos de recorrência locorregional ou de metastização única à distância. [3] De igual forma, a ESMO aconselha (I, A) a utilização de inibidores de PD-1 ou da sua associação com inibidor de CTLA-4 (ipilimumab), independentemente do *status* do gene BRAF. [3]

Apesar do avanço das terapêuticas sistémicas, efetivas na melhoria do prognóstico de doentes com melanoma localmente avançado e metastizado (segundo, respetivamente, uma estratégia adjuvante e definitiva), este não se mostrou suficiente. Ainda se verificam fracos resultados em relação à recorrência tumoral e, por último, à sobrevivência, especialmente nos doentes com doença ganglionar clinicamente evidente. [4,8] Alguns doentes recidivam ainda antes do início da terapêutica adjuvante e quase metade (cerca de 40%) sofre recidiva tumoral, mesmo após o início da terapêutica adjuvante. [9] Por outro lado, o benefício da terapêutica neoadjuvante demonstrado no tratamento de doentes com outros tumores sólidos (como o cancro da mama, do ovário, da bexiga, tumores da cabeça e pescoço, cancro gastroesofágico e anal) fez, considerando as abordagens já utilizadas, despertar o interesse no desenvolvimento de estratégias neoadjuvantes para o tratamento de doentes com doença localmente avançada, mas possivelmente ressecável. [4,7,10]

Deste modo, pretende-se rever as estratégias neoadjuvantes que têm vindo a ser estudadas como possíveis terapêuticas no doente com doença localmente avançada, evidenciando a evolução prognóstica da terapêutica neoadjuvante no melanoma cutâneo.

Materiais e Métodos

A revisão da literatura focou-se na pesquisa das bases de dados *Pubmed* e *Web of Science*, realizada na primeira metade do mês de agosto de 2020.

Foi considerada a combinação "Melanoma"[Mesh] AND "Neoadjuvant Therapy"[Mesh], na *Pubmed* e as expressões “melanoma”, “neoadjuvant therapy”, “immunotherapy”, de forma a alargar os resultados da pesquisa, incluindo as entradas mais recentes e que ainda poderiam não ter sido consideradas segundo a linguagem controlada. O mesmo conjunto de expressões foi utilizado para pesquisa na *Web of Science*.

Consideraram-se os artigos referentes ao melanoma cutâneo, escritos em inglês, português, espanhol e francês, publicados nos últimos 5 anos (ou seja, desde o início de 2015 até à data de pesquisa), uma vez que corresponde ao período de maior desenvolvimento do tema. Foram incluídos ensaios clínicos, estudos comparativos e multicêntricos, revisões e meta-análises. Foram também consideradas as *guidelines* mais recentes da European Society for Medical Oncology (ESMO) para o melanoma cutâneo.

Foram também procuradas algumas das referências utilizadas pelos artigos identificados na pesquisa realizada e selecionadas as mais relevantes.

Desenvolvimento

1. Conceito de neoadjuvante

A abordagem neoadjuvante assenta na administração de terapêutica sistémica antes da resseção cirúrgica. [4]

Tal como evidenciado no tratamento de outros tumores sólidos, [7,10] espera-se conseguir melhorar o prognóstico de doentes selecionados. Deste modo, a aplicação de tratamento neoadjuvante tem como principal objetivo a melhoria da sobrevivência livre de recorrência (local e à distância, RFS) e da sobrevivência geral (OS). [11] A maior parte dos ensaios clínicos que testam estratégias neoadjuvantes consideram a resposta patológica completa (pCR) como um *endpoint* importante. [7] Este *endpoint* é definido pela ausência completa de tumor residual viável [7] e, caso seja estabelecido como preditor de sobrevivência (RFS e OS), poderá ser possível extrapolar a longo prazo os resultados obtidos com os agentes terapêuticos em estudo e individualizar a abordagem terapêutica posterior. [11,12]

Estão-lhe ainda descritas outras vantagens. Por um lado, possibilita a redução da carga tumoral, facilitando a resseção cirúrgica e diminuindo a morbilidade da intervenção. Por outro, fornece informação individualizada potencialmente útil para a compreensão da biologia tumoral, dos mecanismos de resposta e de resistência ao tratamento e, por último, da resposta patológica que, como já referido, pode ser utilizada como indicador prognóstico. Podem ainda ser identificados biomarcadores preditivos de resposta, resistência e toxicidade. [7,9,11] A resposta (prognóstica e toxicológica) à terapêutica sistémica neoadjuvante pode ainda auxiliar na escolha da terapêutica adjuvante. [7]

Têm-se também verificado alterações no microambiente tumoral que propiciam o desenvolvimento de mecanismos de evasão tumoral, que tornam o tumor resistente às terapêuticas sistémicas adjuvantes. Assim, pensa-se que a abordagem neoadjuvante poderá ser mais efetiva por atuar mais precocemente na biologia tumoral. [10]

Contudo, a sua administração atrasa a aplicação da terapêutica *standard* (cirúrgica) e os efeitos adversos podem resultar no aumento da morbilidade e no atraso da resseção cirúrgica, [7] com potencial redução na sobrevivência destes doentes.

Para a ESMO, ainda não existe evidência suficiente que estabeleça a abordagem neoadjuvante como predominante no tratamento do melanoma cutâneo localmente avançado. [6] Desta forma, as estratégias neoadjuvantes devem ser consideradas em contexto de ensaio clínico. São exceções os casos de metastização ganglionar volumosa (*bulky nodal*) com ou sem metastização em trânsito, ou seja, casos de doença ressecável, mas cuja excisão cirúrgica é tecnicamente exigente, podendo associar-se a morbilidade significativa. [6]

As principais estratégias neoadjuvantes em estudo utilizam a imunoterapia e a terapia dirigida. Antes, já tinham sido estudados regimes de quimioterapia (alguns associados a interferão alfa e a interleucina 2) e regimes de interferão alfa de alta dose. [10]

2. Abordagem neoadjuvante antes das novas terapêuticas

2.1. Quimioterapia

O desenvolvimento da estratégia neoadjuvante iniciou-se pela terapêutica utilizada no melanoma metastático. [8,12] A quimioterapia era, antes do desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, considerada o tratamento *standard* no melanoma avançado. [12] Já tinham sido demonstradas taxas de resposta tumoral de até 40% na combinação de agentes quimioterápicos (cisplatina, vimblastina e dacarbazina), superiores até duas vezes às obtidas com monoterapia (dacarbazina). [13] No entanto, verificou-se que a poliquimioterapia não aumentava significativamente a sobrevivência dos doentes com doença metastática, para além de estar associada a maior toxicidade. [14] De igual forma, a monoterapia (seja dacarbazina ou temozolomida – forma oral da dacarbazina) não mostrou benefício na sobrevivência dos doentes com melanoma metastático. [14] Ainda assim, a quimioterapia foi estudada no contexto neoadjuvante. [8,12]

A temozolomida é um agente alquilante e precursor do metabolito ativo MTIC. Tem uma boa biodisponibilidade oral e atravessa a barreira hematoencefálica. [15] Tal como a dacarbazina, promove a apoptose celular por lesão no DNA. [14] A temozolomida foi testada em doentes com melanoma possivelmente ressecável (estádios III e IV – M1a). [15] O regime terapêutico consistiu em 6 semanas consecutivas de quimioterapia neoadjuvante (75mg/m²/dia), a cada ciclo de 8 semanas, seguida de cirurgia. Apenas 16% dos doentes atingiu resposta clínica (duas respostas completas e uma resposta parcial), sendo que todos os doentes que responderam tinham doença de estágio III. Doze dos 19 doentes testados recorreram antes da cirurgia, recebendo apenas um ciclo ou menos de quimioterapia. A temozolomida foi bem tolerada, com a maioria dos efeitos adversos reportados de grau 2. 14% dos doentes desenvolveram linfopenia, 14% elevação das transaminases e 9% hiperglicemia, todos de grau 3. Pretendia-se ainda determinar se a proporção de resposta seria superior na doença ressecável, quando comparada com a já obtida na doença metastática irressecável. No entanto, essa superioridade não foi demonstrada, tanto que a probabilidade de resposta clínica se mostrou idêntica em ambos os estádios de doença. [15]

Deste modo, a quimioterapia não se verificou efetiva no tratamento neoadjuvante, nem na doença metastática, pelo que está, atualmente, apenas reservada para alguns casos. [8]

2.2. Bioquimioterapia

A bioquimioterapia baseia-se na combinação de agentes quimioterápicos com interferão alfa e interleucina 2. [14] O IFN- α e a IL-2 são citocinas estimuladoras do sistema imunitário. O IFN- α terá ainda uma ação antiproliferativa, diferenciadora, pró-apoptótica e antiangiogénica.

Já a IL-2 está envolvida na proliferação de células T. [14] Também a bioquimioterapia foi estudada a título neoadjuvante. [8,12]

No primeiro ensaio reportado, [16] foi estudada a combinação de cisplatina, vimblastina, dacarbazina, interferão alfa e interleucina 2 em doentes com doença locoregional ressecável – foram incluídos 64 doentes com metastização ganglionar, satélite, em trânsito ou com recorrência local. O regime incluía dois a quatro ciclos de bioquimioterapia antes da cirurgia, seguidos de dois ciclos adicionais, nos casos de resposta clínica evidente. 44% dos doentes atingiram resposta clínica parcial e 6.5% atingiram resposta patológica completa. Estes últimos alcançaram uma significativa redução da carga tumoral, apesar de não existir correlação entre a carga tumoral e a resposta ($p = 0.34$). Após 27 meses de seguimento mediano, a RFS foi 44% e a OS 58%. Os doentes com resposta tumoral apresentaram melhor sobrevivência livre de recorrência ($p = 0.0001$) sem, contudo, existir o mesmo benefício na sobrevivência geral ($p = 0.055$). Os efeitos adversos mais graves reportados foram hematológicos. 89% desenvolveram neutropenia e 19% trombocitopenia, de grau 4. Todos os doentes sofreram diminuição da sua performance *status*, 91% de grau 3 e 4. Febre e arrepios, hipotensão, náuseas, vômitos e diarreia foram reportados por todos os doentes, ainda que menos graves. Foram necessárias terapêutica de suporte e redução de dose em 37.5% dos doentes. [16]

Uma combinação semelhante de bioquimioterapia foi estudada noutro ensaio. [17]. Quarenta e oito doentes com atingimento ganglionar regional receberam dois ciclos de terapêutica combinada antes da disseção linfática completa, e outros dois ciclos a título adjuvante. 38.9% dos doentes com doença mensurável (36) atingiram resposta clínica (uma completa e treze parciais, que correspondem a 2.8% e a 36.1%, respetivamente). 11.1% atingiram resposta patológica completa. Após um seguimento mediano de 31 meses, a PFS foi 64.6% e a OS foi 79.2%. Constatou-se uma melhoria na sobrevivência dos doentes com resposta ao tratamento e um pior prognóstico naqueles com múltiplos gânglios ainda positivos à data da cirurgia. [17] A toxicidade descrita assemelhou-se à já reportada, [16] tendo sido necessário adiar o tratamento em 44% dos doentes para resolução de alterações hematológicas e sintomas constitucionais. [17]

O último ensaio reportado, multicêntrico, [18] teve como objetivo estudar um regime idêntico de bioquimioterapia, num grupo maior de doentes (92) com melanoma de estágio III, após avaliação histológica. O regime incluía dois ciclos de bioquimioterapia seguidos de cirurgia e disseção linfática completa e de outros dois ciclos de bioquimioterapia. 26% dos doentes com doença mensurável (50) atingiram resposta clínica (duas completas e onze parciais, que correspondem a 4% e a 22%, respetivamente). 26% atingiram resposta patológica completa. Após 40.4 meses de *follow-up* mediano, a RFS foi 64% e a OS foi 78%. Verificou-se que os

doentes com gânglio sentinela positivo apresentaram melhores valores de sobrevivência livre de recorrência e de sobrevivência geral, quando comparados com os doentes com doença clinicamente evidente, apesar desse benefício não ser estatisticamente significativo ($p = 0.053$ e $p = 0.085$, respetivamente). Febre, anorexia e cansaço ocorreram em todos os doentes. 40% e 37% desenvolveram neutropenia de graus 3 e 4, respetivamente. 77% desenvolveram trombocitopenia de grau 3. Em 38% dos doentes foi necessário reduzir doses e/ou adiar o tratamento. Dezasseis doentes interromperam o tratamento, devido à toxicidade associada. [18]

Embora a bioquimioterapia tenha demonstrado melhores taxas de resposta que a quimioterapia, chegando a reportar-se alguns casos de resposta patológica completa, estes valores ainda são baixos. Tendo em conta a toxicidade da terapêutica e a exigência de internamento e vigilância hospitalares, [8] a sua utilização neoadjuvante deixou de ser considerada. [8,10]

Ainda na doença metastática, a bioquimioterapia, apesar de melhorar as taxas de resposta tumoral, não se traduziu no aumento significativo da sobrevivência (em relação à quimioterapia), para além de estar associada a maior toxicidade. [14,19]

2.3. Interferão alfa

O melanoma é um tumor imunogénico, capaz de produzir respostas imunológicas. Neste contexto, já tinham sido observadas regressões tumorais espontâneas e identificados infiltrados linfoides do doente no tumor primário, como também já se tinham verificado respostas tumorais duradouras, após o tratamento com agentes imunoestimuladores. [14,20] Assim, o sistema imunitário do doente com melanoma parece ser capaz de desencadear uma resposta contra o tumor, originando uma resposta imune celular com potencial significado prognóstico e preditivo. [20]

O interferão alfa foi a primeira citocina a demonstrar atividade no tratamento do melanoma metastático, chegando a ser observadas taxas de resposta tumoral de 10 a 20%. [14] Essa atividade também foi demonstrada no tratamento adjuvante de doentes com melanoma localmente avançado, com benefício estatisticamente significativo na sobrevivência livre de recorrência e na sobrevivência geral ($p < 0.001$ e $p < 0.002$, respetivamente). [21]

O IFN- α é um interferão tipo I produzido, de forma endógena, pelos macrófagos. São-lhe reconhecidos efeitos antitumorais, [21] nomeadamente atividade imunomoduladora indireta (de maior importância) e atividade antiangiogénica, pró-apoptótica e citotóxica direta, [22] ainda que o mecanismo de ação permaneça desconhecido. [21]

Assim, considerando as características imunológicas do melanoma e a potencial ação do interferão alfa, também este foi avaliado como terapêutica neoadjuvante. [22] Foram selecionados 20 doentes com melanoma localmente avançado (estádios IIIB/C), confirmado por biópsia ganglionar. O tratamento iniciou-se com a administração de uma alta dose de IFN- α (HDI, 20MU/m²/dia), como terapêutica de indução, 5 dias por semana, durante 4 semanas, seguido de linfadenectomia regional radical. Após recuperação da cirurgia, repetiu-se a administração de IFN- α , numa dose mais baixa (10MU/m²/dia), como terapêutica de manutenção, 3 dias por semana, durante 48 semanas. 5% dos doentes atingiram resposta clínica completa e 50% resposta clínica parcial. 15% atingiram resposta patológica completa. Após 18.5 meses de *follow-up* mediano, a RFS foi 50% e a OS foi 65%. Constatou-se que os valores da sobrevivência livre de recorrência e da sobrevivência geral eram superiores nos doentes com resposta clínica, apesar de não serem estatisticamente significativos ($p = 0.15$ e $p = 0.17$, respetivamente). Foram registados efeitos adversos graves (de graus 3 e 4) relacionados com a terapêutica administrada, tendo sido necessária a redução de dose em 20% dos doentes. Procurou-se ainda correlacionar a resposta tumoral com as alterações imunológicas identificadas. Deste modo, os doentes com resposta clínica apresentaram um aumento de células mononucleares que infiltravam o tumor. No entanto, não se verificaram alterações imunológicas nos compartimentos peritumoral e perivascular. Também não se identificaram alterações na angiogénese, na proliferação ou na apoptose de células de melanoma. [22]

A utilização do IFN- α neoadjuvante demonstrou a possibilidade de modular o microambiente tumoral, [8] evidenciando a atividade imunomoduladora indireta como mecanismo primordial de ação. [22] Para além disso, a presença de infiltrados de células T em metástases ganglionares regionais associou-se a benefício na sobrevivência. [20] Por último, a sua aplicação em monoterapia permitiria diminuir as interações existentes na bioquimioterapia, uma vez que alguns dos agentes quimioterápicos associados são imunossupressores e podem antagonizar ou alterar os efeitos imunomoduladores do interferão alfa. [22]

3. Imunoterapia neoadjuvante

A imunoterapia neoadjuvante, baseada no bloqueio de *checkpoints*, mostrou, em modelos pré-clínicos de cancro da mama, conferir melhor prognóstico que a imunoterapia adjuvante. [23] Esta maior eficácia da imunoterapia neoadjuvante parece ser explicada pela capacidade em aumentar o número de células T específicas para antígenos tumorais, que não é atingida de igual forma na imunoterapia adjuvante. De facto, verificou-se maior expansão de células T CD8⁺ específicas para o antígeno tumoral gp70, levando à produção de IFN- γ e TNF no sangue periférico, logo após o tratamento. [23]

As células T CD8⁺ citotóxicas desempenham um papel importante na resposta antitumoral. Reconhecem antígenos tumorais específicos (por meio de células apresentadoras de antígenos) e, ao serem estimuladas, tornam-se efectoras e, portanto, capazes de induzir a morte de células tumorais alvo. [24]

Também em ensaios clínicos foi comparada a capacidade dos regimes neoadjuvante e adjuvante em aumentar o número de células T específicas. [25] Para tal, foram selecionados 20 doentes com melanoma de estágio III palpável. Metade recebeu dois ciclos de ipilimumab + nivolumab a cada 3 semanas, seguidos de disseção linfática e de outros dois ciclos de terapêutica combinada 6 semanas após a cirurgia. A outra metade recebeu quatro ciclos de ipilimumab + nivolumab a cada 3 semanas, 6 semanas após a disseção linfática. Após análise do sangue periférico, verificou-se maior expansão de células T residentes no tumor dos doentes que tinham recebido imunoterapia neoadjuvante. [25]

Desta forma, a presença do tumor primário parece ser necessária para a expansão de células T específicas, [23,25] uma vez que a ativação do sistema imune ocorre em sequência do reconhecimento de antígenos expressos seletivamente por células tumorais. [12] A administração de terapêutica neoadjuvante pode, assim, induzir uma maior e mais ampla resposta celular. [25]

Os recetores de *checkpoints* imunológicos, juntamente com os seus ligandos, são elementos essenciais para a manutenção da tolerância imunológica. No entanto, alguns tumores tiram partido deste mecanismo de tolerância, escapando à resposta celular. [24] Nestes casos, estes recetores acabam por bloquear a sinalização imunológica e prevenir a ação das células T sobre as células tumorais. [20]

A imunoterapia consegue expandir a resposta imunológica que surge já espontaneamente em muitos doentes. [24] Quando baseada na inibição dos recetores de *checkpoints* CTLA-4 e PD-1, mostrou benefício na sobrevivência dos doentes com melanoma avançado (segundo terapêutica adjuvante) [3] e melanoma metastático, [14] pelo que foi estudada na abordagem neoadjuvante. [8]

3.1. Inibidores de CTLA-4

O CTLA-4 (CD152) é um membro da família B7/CD28 e um recetor da superfície celular expresso constitucionalmente pelas células T reguladoras e pelas células T CD4, após a sua ativação. Caracteriza ainda as células T exaustas e também as células tumorais. [24]

A sua ação imunossupressora decorre da diminuição da sinalização do recetor co-estimulador CD28, [24] que lhe é homólogo. [9] Por um lado, expressa maior afinidade que o CD28 pela ligação aos recetores CD80 e CD86 e, por outro, consegue remover esses recetores estimuladores da superfície celular das células apresentadoras de antígenos, reduzindo a sua disponibilidade. [24] Deste modo, aumenta o limiar de ativação das células T, contribuindo para a tolerância imunológica a antígenos do organismo, mas também a antígenos tumorais. [24]

O ipilimumab, uma IgG1 humana, [26] é um anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 e foi o primeiro inibidor de *checkpoint* estudado e utilizado no tratamento de doentes com melanoma. [8,24]

O ipilimumab em monoterapia [26] foi estudado em 33 doentes com doença clinicamente evidente e/ou localmente avançada (estádios IIIB/C). Após biópsia inicial, foram administradas duas doses de ipilimumab (10mg/kg), uma a cada 3 semanas e outras duas doses de ipilimumab após cirurgia, também uma a cada 3 semanas. Três doentes atingiram resposta clínica (duas completas e uma parcial), mas não foi identificada nenhuma resposta patológica completa. Após um seguimento mediano de 17.6 meses, a PFS mediana foi 10.8 meses e a probabilidade de PFS a 6 e a 12 meses foi 0.72 e 0.47, respetivamente. A OS mediana não foi reportada. Após a administração da terapêutica neoadjuvante, foi identificado um aumento de células T reguladoras circulantes no sangue periférico, que se associou a melhor PFS. A associação inversa foi verificada na amostra tumoral, ou seja, a maior presença de células T reguladoras foi reconhecida nos casos de progressão tumoral. Foi também detetado um aumento significativo ($p = 0.02$) dos infiltrados de células T CD8⁺ nas amostras tumorais. Em relação à toxicidade, os efeitos adversos imunomediados foram os mais frequentes. Destes, a diarreia/colite, o *rash* e prurido foram os mais reportados, independentemente do grau de gravidade. 14% dos doentes experienciaram diarreia/colite, 9% elevação dos valores de amilase/lipase e 6% experienciaram hepatite, todos de grau 3. [26]

Estes resultados evidenciaram a capacidade do ipilimumab e, portanto, da imunoterapia, em modular o microambiente tumoral [8] e a resposta imunológica do doente com melanoma, [12] resultando num aumento da sobrevivência, ainda que com alguma toxicidade associada.

Os doentes com melanoma avançado exibem uma forte polarização Th2 específica para determinado antígeno tumoral. Contudo, verificou-se que os doentes que respondiam melhor à terapêutica apresentavam polarização Th1 específica para o mesmo antígeno. [20]

Tanto o interferão alfa como o bloqueio de CTLA-4 são capazes de potenciar a resposta pró-inflamatória e de promover um fenótipo imunológico Th1, [20,27] para além de estarem associados ao aumento de infiltrados de células T no tumor. [27] Considerando ainda os bons resultados conseguidos com o interferão alfa e o ipilimumab, avaliou-se a resposta tumoral perante a combinação destas duas terapêuticas. [27] A 28 doentes, com doença clinicamente evidente e/ou regional (estádios IIIB/C), foi-lhes administrado o esquema de duas doses de ipilimumab (3mg/kg ou 10mg/kg, dependendo do grupo em que tinham sido incluídos) com 3 semanas de intervalo + HDI (20MU/m²/dia) 5 dias por semana durante 4 semanas, seguido de uma dose mais baixa (10MU/m²/dia) em dias alternados durante 2 semanas. Passadas 6 a 8 semanas foram submetidos a cirurgia. O mesmo esquema terapêutico foi depois prolongado – foram administradas mais 4 doses de ipilimumab com 12 semanas de intervalo e a dose mais baixa de interferão alfa por 46 semanas. Para além da resposta tumoral (radiológica e patológica), pretendia-se avaliar o impacto da associação terapêutica na resposta celular e o perfil de segurança de ambas as opções terapêuticas. 36% dos doentes atingiram resposta radiológica (uma completa e nove parciais) e 32% atingiram resposta patológica completa, mas sem diferença significativa entre as doses de ipilimumab. A PFS mediana não foi atingida. A probabilidade de PFS a 6 e a 12 meses foi 0.86 e 0.79, respetivamente. Já a probabilidade de OS a 12 e a 24 meses foi 0.93 e 0.89, respetivamente. Considerando os doentes que atingiram resposta patológica completa (9) ou microscópica residual (2), apenas um doente recorreu, após um *follow-up* mediano de 32 meses. Nessas amostras tumorais, a presença de infiltrados de células T foi superior, mas sem diferença significativa entre as doses de ipilimumab. Verificou-se ainda que durante o tratamento neoadjuvante ocorreu expansão tanto dos infiltrados de células T no tumor primário como das células mononucleares no sangue periférico. Esta expansão associou-se a maior benefício na sobrevivência. Ao longo do tratamento, a clonalidade das células T do sangue periférico foi diminuindo, sendo tanto maior e significativa a diminuição nos doentes que permaneceram livres de recorrência tumoral ($p = 0.025$). As reações adversas imunomediadas foram atribuídas à ação do ipilimumab, verificando-se maior toxicidade (graus 3 e 4) na administração de maior dose de imunoterapia ($p = 0.042$). 93% dos doentes experienciaram hepatite (3% de grau 4) e 50% diarreia/colite. As reações adversas não imunomediadas (as mais reportadas – febre, cansaço, náuseas e vômitos, elevação da creatinina, neutropenia e trombocitopenia) foram reversíveis com a redução da dose de HDI. [27]

3.2. Inibidores de PD-1

O PD-1 (CD279) é um recetor de superfície. É expresso constitucionalmente por algumas populações de células T e por outras células T circulantes, após a sua ativação. Está ainda presente em células T específicas tumorais, tanto circulantes no sangue periférico, como infiltrativas no tecido tumoral. [24]

Apresenta dois ligandos – PD-L1 (B7-H1; CD274) e PD-L2 (B7-DC; CD273) –, que podem ser encontrados na superfície de células apresentadoras de antígenos [24] e de células tumorais. [28] O IFN- γ é considerado o maior estímulo para o aumento da expressão de ambos os ligandos. [24]

Tal como o CTLA-4, a sua atividade imunossupressora relaciona-se com o recetor CD28, através da interação com os seus ligandos. [24,28] A ativação do linfócito T ocorre após a ligação entre os recetores presentes na célula T (complexo TCR, PD-1 e CD28) e os respetivos ligandos (MHC, PD-L1 ou PD-L2 e CD80 ou CD86). Durante o processo de ativação, a fosforilação do ITSM (localizado na porção intracelular do PD-1) provocada pela P56Lck (localizada na porção intracelular de CD4 ou CD8, que está complexada ao TCR) leva ao recrutamento do SHP-2. A associação entre PD-1 e SHP-2 pode provocar a desfosforilação (da porção citoplasmática) do CD28, prevenindo a sua ligação ao PI3K e Grb2 e, com ela, inibir a ativação da célula T e das suas funções efetoras. Deste modo, também o PD-1 contribui para a manutenção da tolerância imunológica. [24] A interferência do PD-1 na sinalização TCR/CD28 diminui ainda a produção de citocinas (nomeadamente IL-2, IFN- γ e TNF- α) e inibe a proliferação celular. Na ausência dos seus ligandos, o PD-1 não é recrutado para a sinapse imunológica e não interfere com a sinalização da ativação celular. [24]

O nivolumab e o pembrolizumab são IgG4 (humana e humanizada, respetivamente) e anticorpos monoclonais anti-PD-1. [9] Já na doença metastática se tinham verificado melhores resultados na sobrevivência com a administração de inibidores de PD-1 que com a de inibidores de CTLA-4, evidenciando ainda os primeiros melhores perfis de toxicidade. [14] De facto, conclusões semelhantes foram obtidas num estudo mais recente, em que foram reportados resultados de 5 anos de imunoterapia administrada a 3 grupos de doentes com melanoma irresssecável ou metastizado (estádio III ou IV). [29] No primeiro grupo foi administrado nivolumab + ipilimumab, no segundo apenas nivolumab e no terceiro apenas ipilimumab. Foram atingidas maiores taxas de resposta tumoral nos grupos terapêuticos que incluíram nivolumab (58%, 45% e 19%, respetivamente), demonstrando-se também maior benefício na sobrevivência nesses grupos – reportou-se uma OS a 5 anos de 52%, 44% e 26% e uma PFS a 5 anos de 36%, 29% e 8%. Já os efeitos adversos graves (de graus 3 e 4) relacionados com a imunoterapia ocorreram em 59%, 23% e 28% dos doentes, evidenciando maior frequência de reações adversas graves no grupo da terapêutica combinada e, depois,

no grupo do ipilimumab. [29] Também o pembrolizumab mostrou benefício na sobrevivência. [30] Após um *follow-up* mediano de 55 meses, a OS estimada a 5 anos foi 34% e a PFS estimada a 5 anos foi 21%. [30]

A superioridade que se foi evidenciando nos resultados obtidos com a terapêutica anti-PD-1 em relação aos obtidos com a terapêutica anti-CTLA-4, tornou os inibidores de PD-1 opção de primeira linha sobre os inibidores de CTLA-4, tanto na terapêutica adjuvante como na abordagem da doença avançada e metastizada, podendo, nesta última, serem associados. [3]

Como já descrito, o mecanismo pelo qual atuam tanto o CTLA-4 como o PD-1 é diferente. [9,24] A ação do CTLA-4 ocorre durante a fase de preparação da ativação da célula T, enquanto que a do PD-1 interfere já na fase de ativação propriamente dita da célula T (durante a ligação entre os recetores celulares). [9] Deste modo, a combinação de ambos na terapêutica neoadjuvante poderia resultar em maior benefício na sobrevivência e prognóstico, tendo ainda em conta o perfil de toxicidade.

Considerando este pressuposto, foram comparadas as terapêuticas combinada e isolada de inibidores de *checkpoints*. [31] Foram estudados 23 doentes com doença localmente avançada (estádios IIIB/C) ou oligometastática possivelmente ressecável (estádio IV). Doze dos doentes receberam 4 doses de nivolumab (3mg/kg), uma dose a cada 2 semanas e os restantes onze doentes receberam 3 doses de nivolumab (1mg/kg) + ipilimumab (3mg/kg), uma dose a cada 3 semanas. Após ressecção cirúrgica, foi-lhes oferecido nivolumab (3mg/kg) a cada 2 semanas até perfazer 13 doses. Nenhum dos doentes tinha recebido imunoterapia antes da inclusão em cada grupo. Este estudo acabou por ser interrompido mais cedo, porque se verificou não só a progressão precoce da doença com a monoterapia, como também o aumento dos efeitos adversos graves relacionados com o tratamento combinado. Dois doentes desenvolveram metastização síncrona e progressão local, impossibilitando a abordagem cirúrgica e oito doentes desenvolveram reações adversas graves (de grau 3). Ainda assim, verificou-se resposta radiológica em 25% dos doentes no grupo do nivolumab e em 73% dos doentes no grupo do nivolumab + ipilimumab. Ainda que não tenha existido correlação entre as respostas radiológica e patológica, 25% e 45% dos doentes, em cada grupo, atingiram resposta patológica completa. Nestes, observou-se uma melhoria na sobrevivência livre de recorrência (local e à distância) e na sobrevivência geral, que não se verificou nos doentes sem pCR. O maior benefício na sobrevivência ocorreu no grupo da terapêutica combinada, ainda que não tenha sido atingida diferença estatística. Neste grupo, a PFS a 17.2 meses foi 82% e a OS a 24.4 meses foi 100%. No grupo da monoterapia, a PFS a 22.6 meses foi 58% e a OS a 22.6 meses foi 76%. No ambiente tumoral, verificou-se maior carga mutacional, assim como maiores infiltrados de células T CD8⁺ e maior expressão de

PD-L1 e de marcadores linfocíticos (granzima B, FOXP3 e PD-1) nos doentes que evidenciaram resposta à terapêutica instituída. Nas amostras tumorais desses doentes, identificou-se maior expansão e diversidade clonal induzida pelo tratamento, que se mostrou superior no grupo da monoterapia. De igual forma, no sangue periférico, verificou-se maior expansão clonal de células T residentes no tumor, superior no grupo da terapêutica combinada. Os efeitos adversos graves reportados com mais frequência incluíram a elevação das transaminases (27%), seguida de colite, pneumonia e hiponatremia (18%) e de hipocaliemia, hipertireoidismo, hiperglicemia, artralguas e mialgias (9%), todos eles de grau 3 e ocorridos nos doentes com terapêutica dupla, sendo necessário atrasar a terapêutica em 64% desses doentes. No total, 73% dos doentes do grupo da imunoterapia combinada reportaram toxicidade de grau 3, enquanto que no grupo da monoterapia, apenas 8% relataram semelhante gravidade. [31]

Tendo ainda em conta os resultados obtidos na comparação das abordagens adjuvante e neoadjuvante da terapêutica combinada de inibidores de *checkpoints* (CTLA-4 e PD-1), [25] observou-se que no grupo da imunoterapia neoadjuvante, sete dos nove doentes avaliados atingiram resposta tumoral – três atingiram resposta patológica completa e três atingiram resposta patológica major ($\leq 10\%$ de células tumorais viáveis). A resposta patológica mostrou-se subestimada pela resposta radiológica. Nenhum dos doentes com resposta patológica (completa ou major) recorreu após um seguimento mediano de 25.6 meses. Neste grupo, 10 doentes com melanoma de estádios IIIB/C receberam 2 ciclos de ipilimumab (3mg/kg) + nivolumab (1mg/kg) a cada 3 semanas, seguidas de disseção linfática e de outros 2 ciclos do mesmo regime terapêutico combinado. Nos doentes que acabaram por sofrer recorrência tumoral, verificou-se menor infiltração tumoral de células T, assim como menor expressão de B2M (que permite inferir a presença de MHC) e de PD-L1 nas amostras tumorais obtidas ainda antes do tratamento. Nestes doentes, a expressão da assinatura de IFN- γ mostrou-se diminuída, independentemente do grupo terapêutico. Os efeitos adversos graves (de graus 3 e 4) relacionados com o tratamento foram muito prevalentes (90%), e mostraram-se superiores aos da doença de estágio IV, levando à descontinuação do mesmo em 90% dos doentes. [25]

A associação entre a elevada taxa de resposta patológica e a elevada toxicidade registada, observada especialmente nos regimes terapêuticos combinados, [25,31] fez sugerir uma menor supressão imunológica sistémica dos doentes candidatos a terapêutica neoadjuvante. [25] Assim, procurou-se identificar que esquemas terapêuticos se mostrariam igualmente efetivos, apresentando um perfil de toxicidade mais aceitável. [32]

Neste sentido, avaliou-se a segurança e a eficácia de três combinações de terapêutica neoadjuvante. [32] Foram selecionados doentes com melanoma localmente avançado

ressecável (estádio III) com metastização ganglionar clinicamente evidente. Os doentes selecionados foram distribuídos por três grupos (A, B e C). No grupo A, 30 doentes receberam dois ciclos de ipilimumab (3mg/kg) + nivolumab (1mg/kg) a cada 3 semanas; no grupo B, 30 doentes receberam dois ciclos de ipilimumab (1mg/kg) + nivolumab (3mg/kg) a cada 3 semanas; e no grupo C, 26 doentes receberam dois ciclos de ipilimumab (3mg/kg) a cada 3 semanas seguidos de dois ciclos de nivolumab (3mg/kg) a cada 2 semanas. Nenhum dos doentes tinha recebido imunoterapia prévia. Após 6 semanas do início da terapêutica, procedeu-se à disseção linfática e não foi administrada terapêutica adjuvante. Nas primeiras 12 semanas, foram reportados efeitos adversos graves (de graus 3 e 4) em 40%, 20% e 50%, respetivamente para cada grupo. Estas reações adversas foram atribuídas à imunoterapia instituída, evidenciando melhor tolerabilidade o regime terapêutico do grupo B. Nos restantes grupos, foi observada com maior frequência a elevação das transaminases (20%, no grupo A) e o aparecimento de colite (19%), seguida de diarreia e *rash* (ambas 12%, todas no grupo C). Apesar de não terem sido registadas mortes relacionadas com a terapêutica, alguns doentes interromperam o tratamento (13%, 17% e 31%) e o grupo C foi encerrado precocemente, devido à elevada incidência de reações adversas graves – cinco doentes desenvolveram colite de grau 3 (necessitando de colectomia) e um doente desenvolveu polineuropatia de grau 4. Por último, apesar de não terem sido atribuídos efeitos adversos da cirurgia à terapia neoadjuvante, esta chegou a ser adiada em três doentes (um do grupo A e dois do grupo C). Em relação à resposta tumoral, 52% dos doentes atingiram resposta radiológica e 74% atingiram resposta patológica, dos quais 43% resposta patológica completa e 17% resposta patológica major. Destes doentes, 47%, 57% e 23% atingiram resposta patológica completa e 23%, 7% e 23% atingiram resposta patológica major, respetivamente em cada grupo. Verificou-se ainda que a resposta radiológica subestimou a patológica. [32] Após um *follow-up* mediano de 17.7 meses, a RFS mediana não foi atingida. No entanto, a RFS estimada a 18 meses foi 90%, 82% e 83%. Durante este período, registou-se apenas uma recorrência nos 64 doentes que tinham atingido resposta patológica (2%), enquanto que nos outros doentes, treze recorreram (62%). No ambiente tumoral, verificou-se o aumento da carga mutacional tumoral e da assinatura de IFN- γ nas situações de resposta patológica, com benefício na RFS. [33] A expressão de PD-L1 tumoral não se mostrou relacionar com a resposta patológica, [32] enquanto que os níveis de PD-1 no sangue periférico aumentaram com o tratamento, independentemente da resposta atingida. [33]

Considerando estes dados e as últimas atualizações deste último estudo, [32,33] o regime terapêutico do grupo B – dois ciclos de ipilimumab (1mg/kg) + nivolumab (3mg/kg) por 6 semanas – mostrou ser o esquema posológico com melhor perfil de toxicidade, enquanto ainda capaz de induzir resposta patológica e reduzir o risco de recorrência tumoral numa elevada proporção de doentes com melanoma localmente avançado ressecável. [32]

O pembrolizumab também foi estudado em doentes com doença de estágio III ou IV ressecável. [34] Vinte e nove doentes receberam uma única dose de pembrolizumab (200mg), tendo sido submetidos a cirurgia 3 semanas depois. Após cirurgia, a imunoterapia foi prolongada por um ano, salvo se a recorrência tumoral ou a toxicidade grave interrompessem o tratamento. Contudo, não foram observados efeitos adversos inesperados que fizessem adiar o esquema terapêutico. Nenhum dos doentes tinha recebido imunoterapia prévia. Dos doentes com amostra tumoral disponível (27), 18.5% atingiram pCR e 11% atingiram resposta patológica major ($\leq 10\%$ de células tumorais viáveis). Após um seguimento mediano de 25 meses, nenhum destes doentes recorreu, pelo que estas respostas patológicas (completa e major) foram associadas a baixo risco de recorrência tumoral, independentemente do estágio. Ainda que a RFS mediana não tenha sido atingida, a RFS a 1 ano foi 63% e a OS a 2 anos foi 93%. Verificou-se ainda que o aumento de infiltrados difusos de células T no tumor se associava a resposta patológica completa ou major ($p < 0.0001$) e a melhoria significativa da RFS ($p = 0.009$). No ambiente tumoral identificou-se, portanto, maior proliferação e infiltração de células T CD8⁺. Também no sangue periférico se identificou maior proliferação de células T CD4, CD8 e células T reguladoras (através do marcador FOXP3). O revigoramento de células T CD8⁺ exaustas evidenciou-se logo na primeira semana após a administração da terapêutica. Nos que recorreram, confirmou-se a presença de fatores de resistência celular e a perda de heterozigotia de B2M e de P53. Os efeitos adversos mais comuns relatados foram o cansaço (62%), *rash* (41%) e prurido (31%). 10% experienciaram *rash*, de grau 3. [34]

Os resultados obtidos com a monoterapia baseada no bloqueio de PD-1 evidenciaram a presença prévia de uma resposta imunológica celular. [31,34] Assim, ainda antes da ação da imunoterapia, parece existir já um reportório diverso de células T CD8 relacionadas com o tumor, mas inibidas. [31] Estas células T exaustas são células T disfuncionais, caracterizadas pela elevada expressão de recetores inibidores. [35] Com a ação dos inibidores de *checkpoint*, estas TEX são rapidamente revigoradas, originando também uma rápida resposta tumoral. [34] De facto, doentes com elevada frequência intratumoral de TEX apresentaram elevadas taxas de resposta. [35] No entanto, os resultados obtidos com a imunoterapia combinada sugerem menor dependência de uma resposta celular prévia, estando, por isso, associada ao aumento de células T residentes no tumor. [31]

O pembrolizumab combinado com o interferão alfa está atualmente a ser estudado. [36] Até à data, 32% dos doentes atingiram resposta patológica completa. E, após um seguimento mediano de 17.4 meses, nenhum desses doentes recorreu. Ainda que não tenham sido publicados dados relativos à sobrevivência, já foi demonstrado o aumento do infiltrado celular e da expressão de PD-1, PD-L1, CD8 e FOXP3. Os efeitos adversos mais graves (graus 3 e 4) relacionaram-se com a ação do HDI, tendo sido descontinuado em 90% dos doentes. [36]

4. Terapia dirigida neoadjuvante

As mutações nos genes BRAF, NRAS e KIT são as mutações ativadoras mais frequentes nas células de melanoma, sendo responsáveis por alterações nas vias de sinalização celular e posterior proliferação tumoral não controlada. [37]

As mutações no oncogene BRAF ocorrem em aproximadamente 50% de todos os melanomas. Mais de 90% dessas alterações ocorrem no codão 600, por substituição de um único nucleótido. Em cerca de 90% dos casos, essa alteração provoca a substituição da valina pelo ácido glutâmico – BRAF^{V600E}. Em 5 a 6%, essa mutação resulta na substituição pela lisina – BRAF^{V600K}. Outras mutações menos frequentes incluem a BRAF^{V600R} e a BRAF^{V600D}. [9,37]

A via MAPK sinaliza processos intracelulares, relacionados com a diferenciação, proliferação e morte celulares. A sua ativação inicia-se pela interação de um fator sinalizador com a porção extracelular do RTK que ativa a família de proteínas RAS que, por sua vez, ativa a família de proteínas RAF – à qual pertence a proteína BRAF. Esta induz a fosforilação de MEK que depois, fosforila e ativa a ERK. Para além de promover o crescimento celular e de inibir a apoptose, a ERK ainda providencia *feedback* negativo aos níveis superiores da via de sinalização. [37] A mutação no gene e proteína BRAF provoca a ativação constitutiva de MEK e, em consequência, de ERK, levando à proliferação celular excessiva. [37]

A inibição da via MAPK, nos casos de mutação do gene BRAF, demonstrou benefício na sobrevivência de doentes com melanoma de estágio IV, [11,14] evidenciando ainda ser superior à quimioterapia. [14] No entanto, a duração da resposta induzida por um único agente inibidor revelou-se curta, devido ao desenvolvimento de resistência à terapêutica. [9] Neste sentido, o bloqueio múltiplo da via MAPK, nomeadamente pela combinação de agentes inibidores BRAF e MEK, demonstrou ser superior ao bloqueio por um único agente inibidor BRAF, [9,11] tanto na terapêutica adjuvante [11] como no tratamento de doença metastática, sem aparentes diferenças no perfil de toxicidade. [14]

A caracterização molecular nos doentes com melanoma é obrigatória nos estádios III e IV (I, A). Nestes, a caracterização do gene BRAF é, também, mandatória (I, A). No caso de o tumor ser negativo para a presença de mutação no *locus* V600 do gene BRAF (BRAF *wild-type*), devem ser sequenciados outros *loci* conhecidos por apresentarem mutações *minor* e avaliar a presença de mutações nos genes NRAS e c-KIT. [3] A terapia dirigida atualmente disponível destina-se aos casos de mutação do gene BRAF (V600) e baseia-se na associação de inibidores BRAF (vemurafenib, dabrafenib, encorafenib) e inibidores MEK (cobimetinib, trametinib, binimetinib). [3]

A associação dabrafenib e trametinib foi estudada no contexto neoadjuvante e comparada com o tratamento *standard* em doentes com melanoma localmente avançado ou

oligometastático (estádio III ou IV), possivelmente ressecável e com mutação BRAF^{V600E} ou BRAF^{V600K}. [38] Os doentes que já tinham tomado inibidores BRAF ou MEK foram excluídos. Sete doentes foram incluídos no grupo de tratamento *standard* (cirurgia + terapêutica adjuvante, em que seis doentes preferiram vigilância pós-cirúrgica e um doente escolheu bioquimioterapia). A outros catorze doentes foi proposto 8 semanas de dabrafenib (150mg, 2x/dia) + trametinib (2mg/dia), seguidos de cirurgia e do mesmo regime de terapia dirigida combinada por mais 44 semanas; destes, doze submeteram-se a cirurgia. Após um seguimento mediano de 7.1 meses, o grupo que incluía terapêutica neoadjuvante mostrou-se superior – cinco doentes recorreram no primeiro grupo, enquanto que apenas dois recorreram no segundo. Desta forma, o grupo de tratamento *standard* acabou por ser encerrado precocemente. Essa diferença acentuou-se ainda mais após um maior período de *follow-up* – após 18.6 meses, todos os doentes do primeiro grupo tinham recorrido, enquanto que no segundo apenas quatro tinham recorrido. A EFS mediana foi 2.9 meses e 19.7 meses, para cada grupo, respetivamente. A terapêutica dirigida neoadjuvante e adjuvante mostrou, assim, estar associada a menor recorrência (local e à distância, $p < 0.0001$ e $p = 0.001$, respetivamente). No entanto, não se verificou diferença significativa entre os grupos, quando avaliada a sobrevivência geral ($p = 0.22$). Ainda nesse grupo, 85% dos doentes atingiram resposta radiológica (duas completas e nove parciais) e 58% atingiram resposta patológica completa sem, contudo, existir correlação entre a respostas radiológica e patológica. Estes doentes apresentaram ainda melhor sobrevivência livre de recorrência à distância quando comparados com os doentes sem pCR. Após um seguimento mediano de 17.3 meses, apenas um doente com pCR recorreu. Dos doentes que não atingiram pCR (5), três recorreram. No tecido tumoral destes doentes, verificou-se o aumento da expressão de ERK fosforilado (pERK), que não se constatou nas amostras tumorais dos que tinham atingido pCR. Aliás, as amostras tumorais dos doentes com pCR apresentavam uma expressão basal de pERK mais baixa ($p = 0.019$), que se manteve ao longo do tratamento. Ainda nas amostras tumorais sem pCR, foram identificadas alterações genéticas conhecidas por conferir resistência à terapia dirigida – localizadas nos genes PTEN, KIT e MAP2K1. Também nessas amostras identificou-se o aumento da expressão de TIM-3 e LAG-3 em células T CD8⁺. Em relação à toxicidade, no grupo que recebeu dabrafenib e trametinib, foram reportados com mais frequência sintomas constitucionais (febre e arrepios) e cefaleias, todos relacionados com a terapêutica, ainda que menos graves (de graus 1 e 2). 15% experienciaram diarreia, de grau 3. 92% dos doentes suspenderam temporariamente o tratamento para atenuar os episódios de febre e 38% necessitaram de redução de dose. [38]

A mesma combinação de terapia dirigida (dabrafenib e trametinib) foi novamente estudada em doentes com melanoma clinicamente evidente ressecável (estádios IIIB/C) e com mutação BRAF^{V600}. [39] Os doentes selecionados não foram submetidos a terapêutica sistémica

anterior. O regime terapêutico combinado consistiu na toma de dabrafenib (150mg, 2x/dia) + trametinib (2mg/dia), durante 12 semanas antes da cirurgia e 40 semanas depois, a título adjuvante. Foram considerados 35 doentes – 34 tinham mutação BRAF^{V600E} e apenas 1 tinha mutação BRAF^{V600K}. 86% dos doentes atingiram resposta radiológica (dezasseis completas e catorze parciais). Todos os doentes atingiram resposta patológica, dos quais 49% atingiram resposta patológica completa. Em mais de metade dos doentes, as respostas radiológica e patológica eram concordantes. Após um seguimento mediano de 27 meses, 4 doentes morreram (um tinha atingido pCR) e 20 recorreram (14 dos quais à distância). A RFS mediana foi 23.3 meses. A RFS a 1 ano e a 2 anos foi 77.1% e 43.4%, respetivamente – no grupo de pCR atingiram-se RFS de 82.4% e 63.3% e no grupo não-pCR atingiram-se RFS de 72.2% e 24.4%, respetivamente. A OS mediana não foi alcançada. A OS a 1 ano e a 2 anos foi 100% e 93.8%, respetivamente. Os doentes com resposta patológica completa apresentaram maior expressão de PD-L1 nas células tumorais e maiores infiltrados tumorais de células T CD8⁺, que se mostraram preditores significativos de resposta patológica ($p = 0.008$ e $p = 0.043$, respetivamente). Não existiram alterações significativas noutros marcadores, como pERK ou FOXP3. Os sintomas constitucionais (febre, arrepios e cansaço), náuseas, mialgias e cefaleias foram as reações adversas relacionadas com a terapêutica mais frequentemente reportadas e menos graves (de graus 1 e 2). Febre de grau 3 e 4 foi experienciada por 9% e 3% dos doentes, respetivamente. 11% descontinuaram o tratamento, devido aos efeitos adversos associados. [39]

Os resultados obtidos sugerem que a combinação terapêutica estudada é tolerável, para além de ser capaz de melhorar o resultado cirúrgico e a sobrevivência dos doentes, uma vez que reduz a carga tumoral e a probabilidade de recorrência. [38,39] Em linha com a imunoterapia, também a terapia dirigida sugere a existência de uma resposta imunológica prévia. [38] Da mesma forma, verifica-se uma menor remodelação do repertório de células T nos doentes com resposta patológica completa, que se traduz por uma maior frequência cumulativa dos clones de células T mais abundantes. Essas células T que contribuem para a resposta contra o tumor parecem, portanto, já estar presentes antes do tratamento. Contudo, a elevada expressão de moléculas de *checkpoint* (TIM-3 e LAG-3) nas células T dos doentes sem resposta patológica completa sugere a disfunção dessas células. [38]

5. Outras terapêuticas com potencial uso neoadjuvante

Para além da terapêutica sistêmica, também a terapêutica intralesional despertou interesse na sua aplicação como estratégia neoadjuvante no tratamento do melanoma cutâneo. [12,40]

A terapêutica intralesional baseia-se na injeção de agentes terapêuticos diretamente no tumor. Possibilita não só a resposta tumoral local, como também limita a exposição sistêmica, aumentando a tolerabilidade ao tratamento. Ainda assim, já foram reportadas respostas sistêmicas, nomeadamente em massas tumorais à distância não tratadas. [12,40]

Algumas terapêuticas intralesionais já são utilizadas no melanoma avançado. O T-VEC demonstrou-se eficaz e seguro no tratamento do melanoma irressecável de estádios III e IV, [41] sendo atualmente, opção terapêutica para os casos de metastização em trânsito. [3]

O T-VEC é um vírus oncolítico, recombinante do HSV-1, capaz de infetar seletivamente as células tumorais. A sua replicação desencadeia a lise dessas células e a libertação de antígenos tumorais, de padrões moleculares (DAMPs e PAMPs virais) e de citocinas que reativam a resposta imunológica local e sistêmica contra o tumor. [41] Desta forma, ao HSV-1 é inserido um gene de fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) humano no lugar do gene da proteína de infeção celular 34.5 e eliminado o gene da proteína de infeção celular 47. A deleção do primeiro gene promove a seletividade da infeção das células tumorais, uma vez que estas não têm o mecanismo de interrupção da síntese proteica característico das células normais, que é inibido por essa proteína de infeção celular. A deleção do segundo gene aumenta a apresentação antigénica das células (tumorais) infetadas pelo vírus. A inserção do gene GM-CSF potencia a resposta imunológica. [41]

O T-VEC neoadjuvante foi estudado no melanoma localmente avançado ressecável (estádios IIIB/C-IVM1a) e comparado com a abordagem cirúrgica isolada. [42] No primeiro grupo, 76 doentes receberam 6 doses de T-VEC seguidas de cirurgia. No segundo grupo, 74 doentes foram submetidos apenas a cirurgia. No grupo da terapêutica neoadjuvante, 21% dos doentes submetidos a cirurgia (57) atingiram resposta patológica completa. Onze dos doentes sofreram progressão da doença antes da cirurgia. A taxa de resposta (completa e parcial) foi 14.7%. [42] A RFS a 1 ano foi 33.5% e 21.9%, respetivamente para cada grupo ($p = 0.048$). A OS a 1 ano foi 95.9% e 85.8% ($p = 0.076$). [43]

Ainda que a sobrevivência livre de recorrência e a sobrevivência geral tenham melhorado com a administração de T-VEC, estas demonstraram-se inferiores às verificadas na terapêutica neoadjuvante sistêmica. [8,11] O T-VEC neoadjuvante encontra-se atualmente a ser estudado combinado com inibidores de PD-1 – nivolumab (NCT04330430) e pembrolizumab (NCT03842943). [12]

O HF10 é um HSV-1 não recombinante, pelo que as alterações potenciadoras de infeção das células tumorais ocorrem naturalmente. [41] Está atualmente em estudo como terapêutica neoadjuvante combinada com o nivolumab, em doentes com melanoma de estádios IIIB/C-IVM1a (NCT03259425). [40,41]

O Daromun resulta da combinação das imunocitocinas L19-IL2 e L19-TNF, obtidas pela fusão entre as citocinas IL-2 e TNF- α com o anticorpo monoclonal L19, que se liga à fibronectina, [12] permitindo a entrega seletiva às células tumorais. [40] O Daromun neoadjuvante está atualmente a ser comparado com a cirurgia isolada (NCT03567889). [12,40]

Por último, o bloqueio de outros *checkpoints* imunológicos como TIGIT, TIM-3, LAG-3 e OX40 representa também potencial uso terapêutico neoadjuvante. [10]

Tabela 1. Estratégias neoadjuvantes utilizadas no tratamento do melanoma localmente avançado ressecável – ensaios clínicos concluídos e publicados.

Estudo	Critérios de inclusão	Regime terapêutico	pCR	FU (meses)	RFS	OS
Shah, <i>et al.</i> [15]	Estádio III ou IV (M1a) ressecável	1 ou mais ciclos de QT neoadjuvante, seguido(s) de cirurgia QT: TMZ (75mg/m ² /dia)	-	-	-	-
Buzaid, <i>et al.</i> [16]	Doença locorregional ressecável	2-4 ciclos de BQT neoadjuvante, seguidos de cirurgia e 2 ciclos de BQT adjuvante BQT: cisplatina (20mg/m ²) + vimblastina (1,5mg/m ²) + dacarbazina (800mg/m ²) + IFN- α (5MU/m ²) + IL-2 (9MU/m ²)	6.5%	27	44%	58%
Gibbs, <i>et al.</i> [17]	Doença locorregional ressecável	2 ciclos de BQT neoadjuvante, seguidos de cirurgia e 2 ciclos de BQT adjuvante BQT: cisplatina (20mg/m ²) + vimblastina (1,6mg/m ²) + dacarbazina (800mg/m ²) + IFN- α (5MU/m ²) + IL-2 (9MU/m ²)	11.1%	31	(PFS) 64.6%	79.2%
Lewis, <i>et al.</i> [18]	Estádio III ressecável	2 ciclos de BQT neoadjuvante, seguidos de cirurgia e 2 ciclos de BQT adjuvante BQT: cisplatina (20mg/m ²) + vimblastina (1,6mg/m ²) + dacarbazina (800mg/m ²) + IFN- α (5MU/m ²) + IL-2 (36MU/m ²)	26%	40.4	64%	78%
Moschos, <i>et al.</i> [22]	Estádios IIIB/C ressecável ⁺	4 semanas de IFN- α (20MU/m ²) neoadjuvante, seguidas de cirurgia e 48 semanas de IFN- α (10MU/m ²) adjuvante	15%	18.5	50%	65%
Tarhini, <i>et al.</i> [26]	Estádios IIIB/C ressecável [†]	2 ciclos de IPI (10mg/kg) neoadjuvante, seguidos de cirurgia e 2 ciclos de IPI (10mg/kg) adjuvante	0	17.6	(PFS) 6M: 72% 1A: 47%	-
Tarhini, <i>et al.</i> [27]	Estádios IIIB/C ressecável [†]	2 ciclos de IPI (3mg/kg ou 10mg/kg) + 4 semanas de IFN- α (20MU/m ²) e 2 semanas de IFN- α (10MU/m ²) neoadjuvante, seguidos de cirurgia e 4 ciclos de IPI (3mg/kg ou 10mg/kg) + 46 semanas de IFN- α (10MU/m ²) adjuvante	32%	32 (pCR)	(PFS) 6M: 86% 1A: 79%	1A: 93% 2A: 89%
Blank, <i>et al.</i> [25]	Estádios IIIB/C ressecável [†]	2 ciclos de IPI (3mg/kg) + NIVO (1mg/kg) neoadjuvante, seguidos de cirurgia e 2 ciclos de IPI (3mg/kg) + NIVO (1mg/kg) adjuvante	33% 33% (pMR)	25.6	-	-
Amaria, <i>et al.</i> [31]	Estádios IIIB/C ou IV ressecável [‡]	Monoterapia: 4 ciclos de NIVO (3mg/kg) neoadjuvante, seguidos de cirurgia e 13 ciclos de NIVO (3mg/kg) adjuvante Terapêutica combinada: 3 ciclos de NIVO (1mg/kg) + IPI (3mg/kg) neoadjuvante, seguidos de cirurgia e 13 ciclos de NIVO (3mg/kg) adjuvante	M: 25% T: 45%	M: 15 T: 15.6	(PFS) M: 58% T: 82%	M: 76% T: 100%

Rozeman, <i>et al.</i> [32]	Estádio III ressecável [†]	A: 2 ciclos de IPI (3mg/kg) + NIVO (1mg/kg) neoadjuvante, seguidos de cirurgia B: 2 ciclos de IPI (1mg/kg) + NIVO (3mg/kg) neoadjuvante, seguidos de cirurgia C: 2 ciclos de IPI (3mg/kg) seguidos de 2 ciclos de NIVO (3mg/kg) neoadjuvante, seguidos de cirurgia	A: 47% 23% (pMR) B: 57% 7% (pMR) C: 23% 23% (pMR)	17.7	18M: A: 90% B: 82% C: 83%	-
Huang, <i>et al.</i> [34]	Estádios IIIB/C ou IV ressecável	1 ciclo de PEMBRO (200mg) neoadjuvante, seguido de cirurgia e de 1 ano de PEMBRO (200mg) adjuvante	18.5% 11% (pMR)	25	1A: 63%	2A: 93%
Amaria, <i>et al.</i> [38]	Estádios IIIB/C ou IV ressecável com mutação BRAF ^{V600E} ou BRAF ^{V600K}	8 semanas de dabrafenib (150mg) + trametinib (2mg) neoadjuvantes, seguidas de cirurgia e 44 semanas de dabrafenib (150mg) + trametinib (2mg) adjuvantes	58%	18.6	(EFS) 19.7 meses	-
Long, <i>et al.</i> [39]	Estádios IIIB/C ressecável com mutação BRAF ^{V600+}	12 semanas de dabrafenib (150mg) + trametinib (2mg) neoadjuvantes, seguidas de cirurgia e 40 semanas de dabrafenib (150mg) + trametinib (2mg) adjuvantes	49%	27	1A: 77.1% 2A: 43.4%	1A: 100% 2A: 93.8%
Andtbacka, <i>et al.</i> [42]	Estádios IIIB/C-IVM1a ressecável	6 doses de T-VEC (primeira dose: 10 ⁶ PFU/mL, restantes: 10 ⁸ PFU/mL), seguidas de cirurgia	21%	-	1A: 33.5%	1A: 95,9%

pCR – Resposta patológica completa (ausência de células tumorais viáveis); pMR – Resposta patológica major ($\leq 10\%$ de células tumorais viáveis); FU – *Follow-up* mediano; M – Monoterapia; T – Terapia combinada.

QT – Quimioterapia; TMZ – Temozolomida; BQT – Bioquimioterapia; IFN- α – Interferão alfa; IPI – Ipilimumab; NIVO – Nivolumab; PEMBRO – pembrolizumab; T-VEC – T. laherparepvec.

[‡]Também incluiu melanoma de origem primária desconhecida.

[†]Também incluiu melanoma da mucosa e de origem primária desconhecida.

[‡]Também incluiu melanoma da mucosa, acral, ocular e de origem primária desconhecida.

[§]Sem metastização em trânsito.

NOTA: o primeiro ensaio baseou-se no estadiamento definido pela AJCC6; os restantes pela AJCC7.

Discussão e Conclusão

A necessidade de melhorar o prognóstico de doentes com melanoma avançado, [4,8,9] juntamente com o benefício na sobrevivência verificado na aplicação de terapêutica neoadjuvante noutros tumores sólidos, [4,7,10] instigou o estudo de estratégias neoadjuvantes no tratamento de estádios avançados de melanoma.

Os primeiros agentes estudados, apesar de evidenciarem ação direta, por lesão nas células do tumor, podendo também demonstrar ação indireta, por estimulação do sistema imune do doente – (bio)quimioterapia –, apresentaram fracos resultados, com valores de resposta patológica completa inferiores a 30% (Tabela 1). Os efeitos adversos relacionados com a terapêutica foram expectáveis. Ainda que a sintomatologia constitucional tenha sido mais frequentemente reportada, as alterações hematológicas foram as reações adversas mais graves a serem relatadas, atingindo graus 3 e 4. [15–18]

Também o interferão alfa apresentou baixa taxa de resposta patológica (Tabela 1). No entanto, foi demonstrada a sua capacidade em modular o microambiente tumoral, tendo-se verificado a presença de infiltrados de células T nas amostras tumorais analisadas. A toxicidade associada foi expectável. [22]

A imunoterapia, baseada na inibição de *checkpoints* CTLA-4 e PD-1, estimula a resposta imunológica do doente, atuando indiretamente no tumor. O bloqueio combinado permitiu atingir maiores taxas de resposta patológica completa que, quando consideradas com as de resposta patológica major, chegaram a valores de até 70% (Tabela 1). De uma forma geral, os doentes com resposta patológica completa ou major apresentaram maior benefício na sobrevivência livre de recorrência, [31,32,34] tanto que na maioria dos estudos considerados, apenas um ou até mesmo nenhum desses doentes recorreu durante o período de seguimento. [25,27,32,34] Os efeitos imunomediados ocorreram com maior frequência nos grupos da terapêutica combinada. [31] Destes, o regime terapêutico que demonstrou maior tolerabilidade (garantindo ainda efetividade) foi a associação de ipilimumab (1mg/kg) + nivolumab (3mg/kg). [32] De facto, já se tinha verificado maior frequência de reações adversas na terapia combinada, seguindo-se a monoterapia com anti-CTLA-4 e, só depois, a monoterapia com anti-PD-1. [24] Os pares diarreia/colite e elevação das transaminases/hepatite foram os efeitos adversos mais graves (de graus 3 e 4) reportados. [26,27,31,32,34]

A terapia dirigida, baseada na inibição dupla da via MAPK, por meio de inibidores BRAF e MEK e na presença do gene BRAF mutado, previne a proliferação excessiva das células tumorais. Tal como na imunoterapia, possibilitou atingir maiores taxas de resposta patológica completa, com valores de 49% e 58% (Tabela 1). De igual forma, os doentes com resposta patológica completa evidenciaram maior benefício na sobrevivência livre de recorrência.

[38,39] Os sintomas constitucionais foram as reações adversas mais comumente relatadas. A febre e a diarreia atingiram níveis de toxicidade maiores (graus 3 e 4). [38,39]

Quando comparadas as respostas patológica e radiológica, estas foram discordantes. [31,38] Procurou-se também determinar marcadores que pudessem estar relacionados com a resposta patológica completa. Nas células tumorais, foi identificada maior expressão de PD-L1 [25,31,39] e maior expressão da assinatura de IFN- γ , [25,33] ainda que a de PD-L1 não se tenha relacionado com a resposta patológica em todos os estudos. [32] A relação positiva verificada no PD-L1 e IFN- γ parece ainda justificar o estímulo que o IFN- γ exerce na expressão de PD-L1. [24,25] Por último, foi constatada menor expressão basal de pERK, que se manteve diminuída com o tratamento. [38] A fosforilação de ERK assegura a ativação da via MAPK, [37] pelo que a sua menor expressão associa-se a menor ativação da via e, portanto, a melhor resposta tumoral nos melanomas com gene BRAF mutado. Nos doentes que acabaram por sofrer recorrência tumoral, não só a expressão de PD-L1 foi inferior, como também a de B2M, sugerindo menor disponibilidade para a apresentação antigénica tumoral. [25] No sangue periférico, verificou-se ainda a expansão de células T residentes no tumor, perante a resposta patológica. [25,31,34]

A ação em alvos específicos, através da utilização da imunoterapia e da terapia dirigida, mostrou-se também capaz de modular o microambiente tumoral. De igual modo, verificou-se o aumento de infiltrados de células T CD8 no tumor, que se traduziram em benefício no prognóstico. Para além dos infiltrados celulares, após a imunoterapia verificou-se o revigoreamento de células T, anteriormente disfuncionais devido à elevada expressão de recetores inibidores. [31] Juntamente com a terapia dirigida, ambas as terapêuticas sugerem a presença de uma resposta imunológica celular prévia contra o tumor, [31,34,38] sustentada pela rápida resposta tumoral [34] e pelas alterações na clonalidade das células T, [38] constatadas nos doentes que atingiram resposta patológica completa. Pelo facto destes doentes evidenciarem menor risco de recorrência, [25,31,32,34,38,39] a resposta patológica completa mostrou-se estar associada a melhoria significativa da sobrevivência livre de recorrência, [44] tornando-a num possível *endpoint* substituto do de sobrevivência. [7] Após meta-análise dos estudos citados anteriormente, [25,31,32,34,38,39] a resposta patológica completa foi observada em 41% dos doentes. Nestes doentes, a RFS a 1 ano foi 95%, enquanto que nos doentes sem pCR foi 62%, pelo que se atingiu diferença significativa ($p < 0.001$). Ainda que a taxa de pCR tenha sido superior nos doentes submetidos a terapia dirigida (47%) quando comparados com os doentes sujeitos a imunoterapia (38%), a RFS a 1 ano mostrou-se superior na imunoterapia – nenhum doente recorreu, ao passo que na terapia dirigida recorreram três doentes. Mesmo não considerando a presença de resposta patológica

completa, verificou-se melhor RFS a 1 ano na imunoterapia que na terapia dirigida (83% vs 65%, $p < 0.001$). Resultados semelhantes verificaram-se na RFS a 2 anos. [44]

Ainda assim, foram apontadas diferenças na metodologia de cada estudo, nomeadamente nos critérios de inclusão (foram incluídos doentes com doença oligometastática), na extensão da ressecção cirúrgica, na existência e duração dos regimes terapêuticos adjuvantes e no tempo de seguimento, [8,44] pelo que surgiu a necessidade da formação do *International Neoadjuvant Melanoma Consortium*, de forma a definir recomendações para os próximos estudos clínicos, tornando-os mais uniformes (tanto na metodologia aplicada como nos *endpoints* definidos), facilitando a posterior investigação translacional. [7]

Em suma, a imunoterapia e a terapia dirigida neoadjuvantes são capazes de originar elevadas taxas de resposta patológica completa e, portanto, capazes de melhorar a sobrevivência livre de recorrência, [44] ainda que não seja possível relacionar o seu impacto no prognóstico a longo prazo. Estas terapêuticas apresentam também um perfil de toxicidade tolerável e expectável. Contudo, os efeitos adversos são ainda responsáveis pela redução de doses e pela suspensão, prorrogação ou até interrupção do tratamento neoadjuvante.

O reconhecimento de marcadores relacionados com a resposta tumoral pode não só auxiliar na identificação de doentes que poderão beneficiar de tratamento neoadjuvante, como também contribuir na definição do prognóstico individual. Por sua vez, a abordagem neoadjuvante poderá auxiliar na estratificação de risco individual, permitindo adaptar a abordagem adjuvante ao risco definido.

Nos doentes sem resposta patológica completa ou após recorrência tumoral, o recurso a terapêuticas combinadas e/ou alternativas pode ser capaz de melhorar o prognóstico. Neste sentido, a associação da imunoterapia com a terapia dirigida pode aumentar a resposta contra o tumor e prevenir o desenvolvimento de mecanismos de resistência. O bloqueio de outros *checkpoints* pode também ser considerado, assim como a terapia intralesional que, apesar de ter demonstrado menor benefício na sobrevivência, pode ser associada à terapêutica sistémica.

A investigação atual (e futura) procura, por último, identificar opções terapêuticas neoadjuvantes efetivas e seguras. Tanto a duração do tratamento como a inclusão e associação de outras terapêuticas a título neoadjuvante ou adjuvante permanecem ainda incertas. Os resultados obtidos precisam ainda de ser verificados em estudos maiores (de fase III) e comparados com as opções terapêuticas adjuvantes disponíveis, que são ainda consideradas parte do tratamento *standard* do melanoma localmente avançado.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Ricardo Vieira a disponibilidade na orientação deste trabalho final, assim como o incentivo demonstrado ao longo do processo de elaboração do mesmo.

Referências bibliográficas

1. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Bastholt L, et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016. *Eur J Cancer*. 2016;63:201–17.
2. Linares MA, Zakaria A, Nizran P. Skin Cancer. *Prim Care. Clin Off Pract*. 2015;42(4):645–59.
3. Michielin O, Van Akkooi ACJ, Ascierto PA, Dummer R, Keilholz U. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019;30(12):1884–901.
4. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(6):472–92.
5. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009;27(36):6199–206.
6. Michielin O, van Akkooi A, Lorigan P, Ascierto PA, Dummer R, Robert C, et al. ESMO consensus conference recommendations on the management of locoregional melanoma: the ESMO Guidelines Committee. *Ann Oncol*. 2020;31(11):1449-1461.
7. Amaria RN, Menzies AM, Burton EM, Scolyer RA, Tetzlaff MT, Antdbacka R, et al. Neoadjuvant systemic therapy in melanoma: recommendations of the International Neoadjuvant Melanoma Consortium. *Lancet Oncol*. 2019;20(7):e378–89.
8. Pelster MS, Amaria RN. Neoadjuvant Immunotherapy for Locally Advanced Melanoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2020;21(2):10.
9. Kelly ZR, Gorantla VC, Davar D. The Role of Neoadjuvant Therapy in Melanoma. *Curr Oncol Rep*. 2020;22(8):80.
10. Liu JY, Lowe M. Neoadjuvant Treatments for Advanced Resectable Melanoma. *J Surg Oncol*. 2019;119(2):216-221.
11. Lowe MC, Kudchadkar RR. Neoadjuvant Therapy for Melanoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2020;29(3):445–53.
12. Garutti M, Buriolla S, Bertoli E, Vitale MG, Rossi E, Schinzari G, et al. “To Anticipate”: Neoadjuvant Therapy in Melanoma with a Focus on Predictive Biomarkers. *Cancers (Basel)*. 2020;12(7):1941.
13. Legha SS, Ring S, Papadopoulos N, Plager C, Chawla S, Benjamin R. A prospective evaluation of a triple-drug regimen containing cisplatin, vinblastine, and dacarbazine

- (CVD) for metastatic melanoma. *Cancer*. 1989;64(10):2024–9.
14. Pasquali S, Hadjinicolaou AV, Chiarion SV, Rossi CR, Mocellin S. Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;2(2):CD011123.
 15. Shah GD, Socci ND, Gold JS, Wolchok JD, Carvajal RD, Panageas KS, et al. Phase II trial of neoadjuvant temozolomide in resectable melanoma patients. *Ann Oncol*. 2010;21(8):1718–22.
 16. Buzaid AC, Colome M, Bedikian A, Eton O, Legha SS, Papadopoulos N, et al. Phase II study of neoadjuvant concurrent biochemotherapy in melanoma patients with local-regional metastases. *Melanoma Res*. 1998;8(6):549-56.
 17. Gibbs P, Anderson C, Pearlman N, LaClaire S, Becker M, Gatlin K, et al. A phase II study of neoadjuvant biochemotherapy for stage III melanoma. *Cancer*. 2002;94(2):470–6.
 18. Lewis KD, Robinson WA, McCarter M, Pearlman N, O'Day SJ, Anderson C, et al. Phase II multicenter study of neoadjuvant biochemotherapy for patients with stage III malignant melanoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(19):3157–63.
 19. Ives NJ, Stowe RL, Lorigan P, Wheatley K. Chemotherapy compared with biochemotherapy for the treatment of metastatic melanoma: a meta-analysis of 18 trials involving 2,621 patients. *J Clin Oncol*. 2007;25(34):5426–34.
 20. Khunger A, Buchwald ZS, Lowe M, Khan MK, Delman KA, Tarhini AA. Neoadjuvant therapy of locally/regionally advanced melanoma. *Ther Adv Med Oncol*. 2019;11:1-19.
 21. Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, Nitti D. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(7):493–501.
 22. Moschos SJ, Edington HD, Land SR, Rao UN, Jukic D, Shipe-Spotloe J, et al. Neoadjuvant treatment of regional stage IIIB melanoma with high-dose interferon alfa-2b induces objective tumor regression in association with modulation of tumor infiltrating host cellular immune responses. *J Clin Oncol*. 2006;24(19):3164–71.
 23. Liu J, Blake SJ, Yong MC, Harjunpää H, Ngiow SF, Takeda K, et al. Improved efficacy of neoadjuvant compared to adjuvant immunotherapy to eradicate metastatic disease. *Cancer Discov*. 2016;6(12):1382–99.
 24. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: mechanisms of action, efficacy and limitations. *Front Oncol*. 2018;8:86.
 25. Blank CU, Rozeman EA, Fanchi LF, Sikorska K, van de Wiel B, Kvistborg P, et al.

- Neoadjuvant versus adjuvant ipilimumab plus nivolumab in macroscopic stage III melanoma. *Nat Med*. 2018;24(11):1655-61.
26. Tarhini AA, Edington H, Butterfield LH, Lin Y, Shuai Y, Tawbi H, et al. Immune monitoring of the circulation and the tumor microenvironment in patients with regionally advanced melanoma receiving neoadjuvant ipilimumab. *PLoS One*. 2014;9(2):e87705.
 27. Tarhini A, Lin Y, Lin H, Rahman Z, Vallabhaneni P, Mendiratta P, et al. Neoadjuvant ipilimumab (3 mg/kg or 10 mg/kg) and high dose IFN- α 2b in locally/regionally advanced melanoma: safety, efficacy and impact on T-cell repertoire. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):112.
 28. Gellrich FF, Schmitz M, Beissert S, Meier F. Anti-PD-1 and novel combinations in the treatment of melanoma - An update. *J Clin Med*. 2020;9(1):223.
 29. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, et al. Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2019;381(16):1535–46.
 30. Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, et al. Five-year survival outcomes for patients with advanced melanoma treated with pembrolizumab in KEYNOTE-001. *Ann Oncol*. 2019;30(4):582–8.
 31. Amaria RN, Reddy SM, Tawbi HA, Davies MA, Ross MI, Glitza IC, et al. Neoadjuvant immune checkpoint blockade in high-risk resectable melanoma. *Nat Med*. 2018;24(11):1649-54.
 32. Rozeman EA, Menzies AM, van Akkooi ACJ, Adhikari C, Bierman C, van de Wiel BA, et al. Identification of the optimal combination dosing schedule of neoadjuvant ipilimumab plus nivolumab in macroscopic stage III melanoma (OpACIN-neo): a multicentre, phase 2, randomised, controlled trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(7):948–60.
 33. Rozeman EA, Menzies AM, Krijgsman O, Hoefsmit EP, van de Wiel BA, Sikorska K, et al. 18-months relapse-free survival (RFS) and biomarker analyses of OpACIN-neo: a study to identify the optimal dosing schedule of neoadjuvant (neoadj) ipilimumab (IPI) + nivolumab (NIVO) in stage III melanoma. *Ann Oncol*. 2019;30(5_ suppl):v910.
 34. Huang AC, Orlovski RJ, Xu X, Mick R, George SM, Yan PK, et al. A single dose of neoadjuvant PD-1 blockade predicts clinical outcomes in resectable melanoma. *Nat Med*. 2019;25(3):454–61.
 35. Levine LS, Mahuron KM, Tsai KK, Wu C, Mattis DM, Pauli ML, et al. Tumor immune profiling-based neoadjuvant immunotherapy for locally advanced melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2020;27(11):4122-30.

36. Najjar Y, McCurry D, Lin H, Lin Y, Davar D, Drabick JJ, et al. A phase I study of neoadjuvant combination immunotherapy in locally/regionally advanced melanoma. *J Clin Oncol*. 2019;37(15_suppl):9586.
37. Sun J, Carr MJ, Khushalani NI. Principles of targeted therapy for melanoma. *Surg Clin North Am*. 2020;100(1):175–88.
38. Amaria RN, Prieto PA, Tetzlaff MT, Reuben A, Andrews MC, Ross MI, et al. Neoadjuvant plus adjuvant dabrafenib and trametinib versus standard of care in patients with high-risk, surgically resectable melanoma: a single-centre, open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(2):181-93.
39. Long GV, Saw RPM, Lo S, Nieweg OE, Shannon KF, Gonzalez M, et al. Neoadjuvant dabrafenib combined with trametinib for resectable, stage IIIB–C, BRAF^{V600} mutation-positive melanoma (NeoCombi): a single-arm, open-label, single-centre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(7):961–71.
40. Sun J, Kirichenko DA, Zager JS, Eroglu Z. The emergence of neoadjuvant therapy in advanced melanoma. *Melanoma Manag*. 2019;6(3):MMT27.
41. Trager MH, Geskin LJ, Saenger YM. Oncolytic viruses for the treatment of metastatic melanoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2020;21(4):26.
42. Andtbacka RHI, Dummer R, Gyorki DE, Berger AC, Conry RM, Demidov L V., et al. Interim analysis of a randomized, open-label phase 2 study of talimogene laherparepvec (T-VEC) neoadjuvant treatment (neotx) plus surgery (surgx) vs surgx for resectable stage IIIB-IVM1a melanoma (MEL). *J Clin Oncol*. 2018;36(15_suppl):9508.
43. Dummer R, Gyorki DE, Hynstrom JR, Berger AC, Conry RM, Demidov L V., et al. One-year (yr) recurrence-free survival (RFS) from a randomized, open label phase II study of neoadjuvant (neo) talimogene laherparepvec (T-VEC) plus surgery (surgx) versus surgx for resectable stage IIIB-IVM1a melanoma (MEL). *J Clin Oncol*. 2019;37(15_suppl):9520.
44. Menzies AM, Rozeman EA, Amaria RN, Huang ACC, Scolyer RA, Tetzlaff MT, et al. Pathological response and survival with neoadjuvant therapy in melanoma: a pooled analysis from the International Neoadjuvant Melanoma Consortium (INMC). *J Clin Oncol*. 2019;37(15_suppl):9503.